

密级：

论文编号：

中国农业科学院 博士学位论文

嗜线虫致病杆菌北京变种抗生素抗性相关基因
的研究

**Research on antibiotics resistance- related gene of
Xenorhabdus nematophila var. *pekingensis***

博 士 研 究 生：龚永兴

指 导 教 师：杨怀文 研究员

申 请 学 位 类 别：农学博士

专 业：农业微生物学

研 究 方 向：微生物基因工程与技术应用

培 养 单 位：研究生院

植物保护研究所

提交日期 2006 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences
Ph. D Dissertation

Research on antibiotics resistance- related gene of
Xenorhabdus nematophila* var. *pekingensis

Ph. D Candidate : Yong-Xing Gong

Advisor : Prof. Huai-Wen Yang

Major : Microbiology in Agriculture

Specialty : Microbiological gene engineering
and technique application

Chinese Academy of Agricultural Sciences

June 2006

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

论文作者签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

论文评阅人、答辩委员名单

论文题目	嗜线虫致病杆菌北京变种抗生素抗性相关基因的研究				
论文作者	龚永兴	指导教师	杨怀文 研究员	培养单位	植物保护研究所

	姓名	职称职务	导师类别	单位	专业
评阅人	周广和	研究员	博导	中国农业科学院植物保护研究所	植物病理学
	刘杏忠	研究员	博导	中国科学院微生物研究所	微生物学
	沈佐锐	教 授	博导	中国农业大学	植物保护
答辩主席	李季伦	教 授	博导	中国农业大学	微生物学
答辩委员	谭华荣	研究员	博导	中国科学院微生物研究所	微生物学
	刘杏忠	研究员	博导	中国科学院微生物研究所	微生物学
	成卓敏	研究员	博导	中国农业科学院植物保护研究所	生物技术
	简 恒	教 授	博导	中国农业大学	植病生防
	张 杰	研究员	博导	中国农业科学院植物保护研究所	生物技术
	朱昌雄	研究员	博导	中国农业科学农业环境与可持续发展研究所	微生物学
答辩时间与地址		2006 年 6 月 16 日 中国农业科学院中日中心大楼 305 会议室			
记录人员		杨秀芬 副研究员 中国农业科学院植物保护研究所			

摘要

嗜线虫致病杆菌北京变种(*X. nematophila* var. *pekingensis*)是本实验室从北京郊区土壤中分离的小卷蛾斯氏线虫(*Steinenema carpocapsae*)的共生细菌,经多年研究发现该菌的代谢产物具有杀虫、抑菌、抗癌等生物活性,有着诱人的开发利用前景。本研究对嗜线虫致病杆菌北京变种的质粒转化技术进行了探讨,对菌株的抗生素相关基因片段进行克隆、功能分析和定位,为菌株的遗传改良提供技术支持与理论依据,同时为获得新的功能基因奠定基础。主要研究结果如下:

- 1) 测定了嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌的抗生素抗性。北京变种对氯霉素、新霉素和卡那霉素敏感;对链霉素、氨苄青霉素和青霉素具有一定的抗性。
- 2) 首次研究了不同质粒转化方法对北京变种 I 型菌株生理生化特性的影响,确定接合转移是适宜菌株遗传操作的最佳方法。用不同方法制备北京变种 I 型菌的感受态细胞,不同方法对菌株影响各异:经电击操作处理的菌株出现卡那霉素抗性,API 试条中 V-P 反应、蔗糖(SAC)、葡萄糖(GLU)和山梨醇(SOR)利用发生了变化,生长曲线呈双 S 型,抑菌活性降低;经 CaCl_2 介导的化学转化操作的菌株其卡那霉素抗性、色素吸收、抑菌活性及生理生化特性也受到影响;而接合转移操作处理方法对菌株影响最小,各方面的特性与野生型菌株基本一致。
- 3) 首次利用接合转移的三亲杂交方法,建立了北京变种 I 型菌株外源质粒转化体系。分别将质粒 pSZ21 和 pLA2917 转化到北京变种 I 型细胞中,对菌株的许多代谢途径及性状产生了较大影响。与野生型菌株相比,分别含有外源质粒 pSZ21 和 pLA2917 的转移接合子在 NBTa 培养基上呈暗红色菌落;生长速度明显提高,提前 12 小时进入指数生长期;一些生理生化反应特别是糖类利用所受影响较大;菌株产素水平也因为质粒的导入而呈大幅度降低的态势。
- 4) 首次从北京变种中克隆得到抗生素相关基因 *xbl* 基因片段。在 GenBank 提交注册 (Accession No.: DQ631811)。*xbl* 基因片段的 15~731 碱基与嗜线虫致病杆菌 ATCC19061 菌株次级代谢物生物合成功能蛋白对应区域同源性为 99%,17~731 碱基与发光杆菌 TTO1 菌株抗生素生物合成类似蛋白的编码基因具有 85% 的序列相似性。
- 5) 对北京变种具有氨苄青霉素水解活性的 *xbl-ah* 基因片段进行原核表达、蛋白纯化及生物活性测定。设计引物从北京变种 I 型细菌中扩增得到 *xbl-ah* 序列,构建原核表达载体 pET28AH,转化到 *E. coli* BL21 (DE3) 细胞中,SDS-PAGE 和 Western blotting 证明该肽段异源表达成功。在不同 IPTG 浓度、温度以及时间等诱导条件下,发现目的肽段均以包涵体的形式表达。包涵体经溶解、变性、透析复性后表现出氨苄青霉素水解活性。对 XBL-AH 复性产物用 AKTA 系统进行亲和层析纯化,并用 ELISA 进行验证。
- 6) 对 *xbl-ah* 基因片段进行定位,表明 *xbl-ah* 基因位于细菌染色体,而非质粒上。本研究从北京变种中首次发现的质粒 pBJ-1 也表现出氨苄青霉素抗性特征,但推测 *xbl-ah* 基因与质粒 pBJ-1 上的氨苄青霉素抗性基因是两个独立的遗传因子,它们在细胞内发挥着各自的功能。

以上结果将对以后嗜线虫致病杆菌北京变种的遗传操作提供技术支持,并为该菌株抗生素的分子生物学研究奠定基础。

关键词：嗜线虫致病杆菌北京变种(*X. nematophila* var. *pekingensis*) 质粒转化技术 抗生素相关
基因 包涵体 氨苄青霉素水解活性

Abstract

Xenorhabdus nematophila var. *pekingensis* is a bacterium symbiotically associated with *Steinernema carpocapose*, an insect pathogenic nematodes which was firstly collected from soil in suburb of Beijing, China. Previous reports in our experiment have revealed that high insecticidal, antimicrobial, and anti-tumour activities are conferred by the metabolites of this strain, among which a variety of antibiotics-active substances show attractive prospect for development and application. So it is important to do some researches concerning its antibiotics through approaches of biology, genetics and molecular biology. This paper was mainly focused on the effects of different plasmid transformation techniques on the physiological and biochemistry properties of this bacterium, and cloning, functional identification and localization of its antibiotics- related gene fragment. The major results were as follows:

- 1 The antibiotics resistance of *X. nematophila* var. *pekingensis* was analyzed. The results indicated that the strain was sensitive to chloramphenicol, neomycin and kanamycin, while possessed various degrees of resistance against streptomycin, penicillin, and ampicillin. The result was laid the foundation for the plasmid selection in following transformation techniques and the basis of molecular biological research on antibiotics- related gene from this strain.
- 2 With several transformation approaches to prepare competent cells of Form I of *X. nematophila* var. *pekingensis*, the effects of these gene manipulation methods on physiological and biochemistry properties of the strain were investigated systematically. It was proved that various methods caused different effects on bacterial metabolism, and conjugation was the most appropriate approach for genetic manipulation. Contrarily, after electroporation, the strain became resistant to kanamycin, the color of colony on NBTA dark red, the V-P, SAC, GLU, and SOR metabolism on API strip were changed, the pattern of growth curve was influenced, and inhibitory activity against *Bacillus subtilis* was decreased. And the influence of CaCl_2 -mediated chemical transformation was similar to electroporation, especially for some properties such as kanamycin resistance, dye absorption, inhibitory activity. Besides, the catalase activity was altered from negative to positive reaction. Comparatively, there is no observable change between the metabolism pathways of cell undergoing conjugation procedure and those of wild type strain.
- 3 Through three-parent-mating of conjugation procedure, plasmids pSZ21 and pLA2917 were transferred into Form I cell of *X. nematophila* var. *pekingensis*, respectively. However, the introduction of exogenous plasmid affected some metabolism pathways and traits greatly. Compared with wild type strain, both pSZ21 and pLA2917 transconjugatants were altered in some aspects: the color of colonies was dark red on NBTA medium, the growth rate promoted rapidly, some physiological and biochemistry properties affected accordingly, and the antibiotics- producing ability decreased sharply.
- 4 An antibiotics-related gene *xbl* fragment was firstly cloned from *X. nematophila* var. *pekingensis* with the accession number of DQ631811. It was showed that 15~731 base of *xbl* gene fragment is highly homologous to the counterpart sequence of *X. nematophila* ATCC19061 (99% identity). Also the

alignment of amino acids sequence that *xbl* encoded implied homology to an unnamed protein product (85% identity) from *Photorhabdus luminescens* TT01, whose function is involved in antibiotics biosynthesis.

- 5 The expression and functional analysis of ampicillin-hydrolyzing active peptide encoded by *xbl-ah* gene fragment, a part of *xhl* gene, was conducted. Gene *xbl-ah* fragment was amplified from strain *X. nematophila* var. *pekingensis*. Then it was ligated into plasmid pET28a(+) to construct a recombined vector pET28AH, which was subsequently transformed into *E. coli* BL21 (DE3) competent cells. Inclusion body of XBL-AH, an approximately 20 kDa peptide, was expressed by IPTG induction. After dissolved, denaturalized, and refolded, XBL-AH peptide was identified to exhibit activity of hydrolyzing ampicillin. XBL-AH was purified with AKTA system and further confirmed with ELISA assay.
- 6 It was revealed that *xbl-ah* gene fragment was not in plasmid, but in genomic DNA. And *xbl-ah* fragment and ampicillin-resistant gene of plasmid pBJ-1, which was firstly isolated and named in this experiment, were proved to be separate genetic elements to exert their functions independently in the bacterium.

These results above will provide some fundamental information for the subsequent research on genetic manipulation and molecular biology of antibiotics of strain *X. nematophila* var. *pekingensis*.

Key words: *X. nematophila* var. *pekingensis*; plasmid transformation technique; antibiotics related gene; inclusion body; ampicillin-hydrolyzing activity.

目 录

第一章 绪论	1
1.1 昆虫病原线虫共生细菌型变研究进展	1
1.1.1 型变	1
1.1.2 型变的可能机理	1
1.1.3 型变的意义	3
1.2 致病杆菌分子生物学研究技术	4
1.2.1 电击转化法	4
1.2.2 化学转化法	4
1.2.3 接合转移法	5
1.3 致病杆菌功能基因研究进展	5
1.3.1 外膜蛋白基因	6
1.3.2 菌毛蛋白基因	6
1.3.3 共生作用相关基因	7
1.3.4 溶血素相关基因	8
1.3.5 杀虫毒素蛋白基因	8
1.3.6 专利保护基因	9
1.3.7 功能未知基因	10
1.4 致病杆菌抗菌代谢产物研究进展	10
1.4.1 致病杆菌抗菌代谢物的抑菌活性	10
1.4.2 致病杆菌的抗菌代谢物质	11
1.5 本研究的立题依据及意义	13
1.5.1 立题依据	14
1.5.2 研究目的和意义	14
第二章 嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株质粒转化体系的研究	16
2.1 北京变种的抗生素抗性研究	16
2.1.1 实验材料	16
2.1.2 实验方法	17
2.1.2.1 抗生素浓度梯度的配制.....	17
2.1.2.2 抗生素抗性的测定.....	17
2.1.3 结果与分析	18
2.1.3.1 氯霉素抗性测定.....	18
2.1.3.2 卡那霉素抗性测定.....	18
2.1.3.3 链霉素抗性测定.....	18
2.1.3.4 新霉素抗性测定.....	19
2.1.3.5 青霉素抗性测定.....	19
2.1.3.6 氨苄青霉素抗性测定.....	20
2.1.4 讨论	20

2.2 不同转化方法对北京变种 I 型菌株生理生化特性的影响	21
2.2.1 实验材料	21
2.2.2 实验方法	22
2.2.2.1 化学转化用感受态细胞的制备	22
2.2.2.2 化学转化用感受态细胞的空白转化	22
2.2.2.3 电击转化用感受态细胞的制备	22
2.2.2.4 电击转化用感受态细胞的空白转化	23
2.2.2.5 接合转移用感受态细胞的制备	23
2.2.2.6 接合转移用感受态细胞的空白转化	23
2.2.2.7 菌落对色素的吸收	23
2.2.2.8 菌落在 API 试条的反应	24
2.2.2.9 菌落过氧化氢酶活性测定	24
2.2.2.10 菌落生长曲线的制定	24
2.2.2.11 菌落抑菌活性的测定	24
2.2.3 结果与分析	24
2.2.3.1 不同转化方法对北京变种卡那霉素抗性的影响	24
2.2.3.2 不同转化方法对北京变种色素吸收的影响	25
2.2.3.3 不同转化方法对北京变种细胞内代谢作用的影响	25
2.2.3.4 不同转化方法对北京变种过氧化氢酶活性的影响	27
2.2.3.4 不同转化方法对北京变种生长曲线的影响	27
2.2.3.6 不同转化方法对北京变种抑菌活性的影响	28
2.2.4 讨论	28
2.2.4.1 转化操作对北京变种卡那霉素抗性的影响	28
2.2.4.2 不同转化方法对北京变种生理生化特性的影响	29
2.3 外源质粒导入对北京变种生理生化特性的影响	30
2.3.1 实验材料	30
2.3.2 实验方法	31
2.3.2.1 大肠杆菌感受态细胞的制备	31
2.3.2.2 供体质粒和帮助质粒在感受态细胞的电击转化	31
2.3.2.3 质粒在北京变种中的接合转移	31
2.3.2.4 转移接合子的 PCR 鉴定	32
2.3.2.5 转移接合子中质粒的提取	33
2.3.2.6 转移接合子对色素的吸收	33
2.3.2.7 转移接合子过氧化氢酶活性的测定	33
2.3.2.8 转移接合子在 API 试条的反应	33
2.3.2.9 转移接合子生长曲线的制定	33
2.3.2.10 转移接合子抑菌活性的测定	33
2.3.2.11 转移接合子氯霉素抗性的测定	33
2.3.3 结果与分析	34
2.3.3.1 供体质粒和帮助质粒在大肠杆菌的转化	34
2.3.3.2 质粒在嗜线虫致病杆菌北京变种的接合转移	34
2.3.3.3 转移接合子的 PCR 鉴定	35

2.3.3.4	转移接合子质粒的稳定性.....	36
2.3.3.5	转移接合子对色素的吸收.....	36
2.3.3.6	转移接合子的代谢及生化特征.....	37
2.3.3.7	转移接合子的生长曲线变化.....	38
2.3.3.8	转移接合子的抑菌活性.....	39
2.3.3.9	pSZ21 转移接合子的氯霉素抗性	40
2.3.4	讨论	41
2.3.4.1	北京变种遗传转化体系的构建.....	41
2.3.4.2	外源质粒导入对北京变种 I 型菌株代谢的影响	41
2.3.4.3	pSZ21 转化接合子的抑菌活性降低不一定由 Tn5 转座引起.....	42
第三章 嗜线虫致病杆菌北京变种抗生素抗性相关基因的研究		43
3.1	抗生素相关基因 <i>xbl</i> 的克隆与序列分析	43
3.1.1	实验材料	43
3.1.2	实验方法	44
3.1.2.1	引物设计和合成.....	44
3.1.2.2	北京变种 I 型菌株基因片段的 PCR 扩增.....	44
3.1.2.3	PCR 产物的纯化、连接和转化.....	44
3.1.2.4	阳性克隆的确定.....	46
3.1.2.5	序列测定.....	46
3.1.3	结果与分析	46
3.1.3.1	<i>xbl</i> 基因片段的 PCR 扩增	46
3.1.3.2	<i>xbl</i> 基因片段的测序.....	47
3.1.3.3	<i>xbl</i> 基因片段的序列分析.....	47
3.1.3.4	<i>xbl</i> 基因序列在 Genbank 中的注册	50
3.1.4	讨论	50
3.2	氨苄青霉素水解活性肽段 XBL-AH 的表达与纯化.....	52
3.2.1	实验材料	52
3.2.2	实验方法	54
3.2.2.1	表达载体的构建及诱导表达.....	54
3.2.2.2	蛋白质 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳	55
3.2.2.3	Western blotting.....	56
3.2.2.4	包涵体的纯化、变性与复性.....	56
3.2.2.5	蛋白含量测定.....	57
3.2.2.6	氨苄青霉素水解活性测定.....	57
3.2.2.7	诱导表达 XBL-AH 的蛋白纯化.....	58
3.2.2.8	ELISA 检测	58
3.2.3	结果与分析	58
3.2.3.1	<i>xbl-ah</i> 基因编码氨基酸的结构预测	58
3.2.3.2	<i>xbl-ah</i> 基因的 PCR 扩增.....	60
3.2.3.3	携带北京变种 <i>xbl-ah</i> 基因的质粒 pET28AH 的构建	60
3.2.3.4	重组表达载体 pET28AH 的诱导表达	62

3.2.3.5	XBL-AH 包涵体的鉴定.....	64
3.2.3.6	XBL-AH 包涵体的变性与复性.....	65
3.2.3.7	XBL-AH 表达产物的氨苄青霉素水解活性.....	65
3.2.3.8	XBL-AH 表达产物的进一步纯化.....	66
3.2.4	讨论	67
3.2.4.1	XBL-AH 表达产物包涵体的形成.....	67
3.2.4.2	XBL-AH 包涵体的复性与纯化.....	67
3.2.4.3	抗生素相关基因片段 <i>xbl-ah</i> 的意义	67
3.3	北京变种 <i>xbl-ah</i> 基因的分布.....	69
3.3.1	实验材料	69
3.3.2	实验方法	70
3.3.2.1	北京变种 I 型菌株基因组 DNA 的提取.....	70
3.3.2.2	北京变种 I 型菌株质粒 DNA 的提取.....	71
3.3.2.3	北京变种 I 型菌株质粒在大肠杆菌中的转化	71
3.3.2.4	抗生素抗性测定.....	71
3.3.2.5	北京变种 I 型菌株基因组和质粒中 <i>xbl-ah</i> 基因的 PCR 扩增.....	71
3.3.3	结果与分析	72
3.3.3.1	北京变种 I 型菌株基因组 DNA 的提取.....	72
3.3.3.2	北京变种 I 型菌株质粒 DNA 的提取.....	72
3.3.3.3	质粒 pBJ-1 在大肠杆菌中的转化	73
3.3.3.4	质粒 pBJ-1 的抗生素抗性测定	73
3.3.3.5	北京变种 I 型菌株 <i>xbl-ah</i> 基因的定位	73
3.3.4	讨论	74
3.3.4.1	北京变种 I 型菌质粒 pBJ-1 的发现.....	74
3.3.4.2	抗生素抗性的起源与进化.....	74
第四章	结论与展望.....	76
4.1	结论	76
4.2	创新点	76
4.3	展望	77
参考文献		79
致谢		90

图表目录

图 1-1 致病杆菌产生抑菌物质的化学结构.....	12
图 2-1 不同转化方法对嗜线虫致病杆菌北京变种色素吸收的影响.....	25
图 2-2 不同转化方法对嗜线虫致病杆菌北京变种细胞代谢反应的影响.....	26
图 2-3 不同转化方法对嗜线虫致病杆菌北京变种生长曲线的影响.....	27
图 2-4 不同转化方法对嗜线虫致病杆菌北京变种抑菌活性的影响.....	28
图 2-5 分别转化到大肠杆菌中的供体质粒和帮助质粒.....	34
图 2-6 用引物 14-2 对嗜线虫致病杆菌北京变种 pSZ21 接合子的 PCR 扩增.....	35
图 2-7 用引物 14-2 对嗜线虫致病杆菌北京变种 pLA2917 接合子的 PCR 扩增.....	35
图 2-8 用引物 nptII 对嗜线虫致病杆菌北京变种 pSZ21 接合子的 PCR 扩增.....	35
图 2-9 用引物 nptII 对嗜线虫致病杆菌北京变种 pLA2917 接合子的 PCR 扩增.....	36
图 2-10 嗜线虫致病杆菌北京变种 pSZ21 接合子的质粒稳定性.....	36
图 2-11 嗜线虫致病杆菌北京变种 pLA2917 接合子的质粒稳定性.....	36
图 2-12 嗜线虫致病杆菌北京变种转移接合子对色素的吸收.....	37
图 2-13 嗜线虫致病杆菌北京变种转移接合子的细胞代谢反应.....	37
图 2-14 嗜线虫致病杆菌北京变种转移接合子的生长曲线.....	39
图 2-15 嗜线虫致病杆菌北京变种 pSZ21 转移接合子抑菌圈直径的频率分布.....	39
图 2-16 嗜线虫致病杆菌北京变种 pLA2917 转移接合子抑菌圈直径的频度分布.....	40
图 3-1 大肠杆菌 E102 菌株 ampC 型 β -内酰胺酶基因的核苷酸序列.....	46
图 3-2 嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌中 <i>xbl</i> 基因片段的 PCR 扩增.....	47
图 3-3 嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株 <i>xbl</i> 基因片段的核苷酸序列.....	47
图 3-4 <i>xbl</i> 基因片段的序列比对.....	48
图 3-5 <i>xbl</i> 基因片段推测编码氨基酸序列的同源性聚类分析.....	48
图 3-6 北京变种 <i>xbl</i> 基因核苷酸序列与 ATCC19061 菌株的 blastn 比对.....	49
图 3-7 北京变种 <i>xbl</i> 基因核苷酸序列与 ATCC19061 菌株的 blastp 比对.....	50
图 3-8 发光杆状菌抗生素相关基因的定位.....	51
图 3-9 XBL-AH 肽段的氨基酸序列及二级结构预测.....	58
图 3-10 嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株 XBL-AH 肽段的跨膜结构预测 (TMHMM).....	59
图 3-11 嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株 XBL-AH 肽段的跨膜结构预测 (TMPRED).....	59
图 3-12 嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌中 <i>xbl-ah</i> 基因的扩增.....	60
图 3-13 pET28AH 构建示意图.....	61
图 3-14 重组表达载体 pET28AH 的限制性酶切.....	62
图 3-15 重组表达载体 pET28AH 的诱导表达.....	62
图 3-16 XBL-AH 表达产物的 Western 杂交.....	63
图 3-17 不同浓度 IPTG 对 XBL-AH 产物的诱导表达.....	63
图 3-18 不同温度下 XBL-AH 包涵体的诱导表达.....	64
图 3-19 20 温度下 XBL-AH 包涵体的诱导表达.....	64
图 3-20 XBL-AH 包涵体的变性与复性.....	65
图 3-21 氨苄青霉素 OD ₂₃₅ 吸收的标准曲线.....	65
图 3-22 XBL-AH 表达产物的氨苄青霉素水解活性.....	66
图 3-23 XBL-AH 表达产物在 HiTrap 层析柱中的纯化.....	66

图 3-24 嗜线虫致病杆菌北京变种基因组 DNA 的提取	72
图 3-25 嗜线虫致病杆菌北京变种质粒的提取	72
图 3-26 嗜线虫致病杆菌北京变种质粒 pBJ-1 的转化	73
图 3-27 嗜线虫致病杆菌北京变种 <i>xbl-ah</i> 基因在基因组和质粒 DNA 中的 PCR 扩增	74
表 1-1 致病杆菌属细菌的抑菌谱	10
表 1-2 致病杆菌属对植物病原真菌的抑制效果	11
表 1-3 致病杆菌中分离鉴定的抑菌代谢物	13
表 2-1 嗜线虫致病杆菌北京变种的氯霉素抗性测定	18
表 2-2 嗜线虫致病杆菌北京变种的卡那霉素抗性测定	18
表 2-3 嗜线虫致病杆菌北京变种的链霉素抗性测定	19
表 2-4 嗜线虫致病杆菌北京变种的新霉素抗性测定	19
表 2-5 嗜线虫致病杆菌北京变种的青霉素抗性测定	19
表 2-6 嗜线虫致病杆菌北京变种的氨苄青霉素抗性测定	20
表 2-7 不同转化方法对嗜线虫致病杆菌北京变种卡那霉素抗性的影响	25
表 2-8 不同转化方法对嗜线虫致病杆菌北京变种细胞代谢反应的影响	26
表 2-9 不同转化方法对嗜线虫致病杆菌北京变种过氧化氢酶活性的影响	27
表 2-10 嗜线虫致病杆菌北京变种转移接合子的细胞代谢及生化反应	38
表 3-1 质粒 pBJ-1 转化大肠杆菌的抗生素抗性	73

英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
ADH	Arginine dihydrolase	精氨酸双水解酶
Ala	Alanine	丙氨酸
AMY	Amygdalin	苦杏仁甙
ARA	Arabinose	阿拉伯糖
CIT	Citrate	枸橼酸盐
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide	十六烷基三甲溴化胺
GEL	Gelatine	明胶
GLU	Glucose	葡萄糖
Glu	Glutamic acid	谷氨酸
His	Histidine	组氨酸
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IND	Indole	吲哚
INO	Inositol	肌醇
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
LDC	Lysine decarboxylase	赖氨酸脱羧酶
MAN	Mannitol	甘露醇
MEL	Melibiose	密二糖
ODC	Ornithine decarboxylase	鸟氨酸脱羧酶
ONPG	O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside	邻硝基苯- β -吡喃半乳糖苷
ORF	Open reading frame	开放阅读框
RHA	Rhamnose	鼠李糖
SAC	Sacrose	蔗糖
SOR	Sorbitol	山梨醇
TDA	Tryptophan decarboxylase	色氨酸脱羧酶
Tn	Transposon	转座子
URE	Urea	尿素
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside	5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-吡喃半乳糖苷

第一章 绪论

昆虫病原线虫共生细菌是存在于昆虫病原线虫肠道内的一类细菌,革兰氏阴性,属肠杆菌科(Enterobacteriaceae) (Thomas & Poinar, 1979)。现已描述的共生菌有两个属——致病杆菌属(*Xenorhabdus*)和发光杆菌属(*Photorhabdus*),分别与斯氏属线虫(*Steinernema*)和异小杆属线虫(*Heterorhabditis*)共生(Ehlers, 1988; Poinar, 1990; Fischer, 1999)。昆虫病原线虫共生菌具有广泛的杀虫抑菌活性,有望成为新型生防微生物资源之一(Bowen et al, 1998; ffrench-Constant & Bowen, 1999; ffrench-Constant et al, 2000; Ehlers, 2001; Waterfield, 2001; Khandelwal et al, 2004),因此,昆虫病原线虫共生细菌的生物学、遗传学以及分子生物学研究越来越引起科学家的兴趣。

1.1 昆虫病原线虫共生细菌型变研究进展

1.1.1 型变

细菌能够通过被称为型变的遗传不稳定性方式来适应环境的变化。多年以来,人们就知道在沙门氏菌(*Salmonella* spp.)、奈瑟氏球菌(*Neisseria* spp.)和其它生物中存在着型变。致病杆菌(*Xenorhabdus*)和光杆状菌(*Photorhabdus*)的一个显著特点是在共生菌延期培养期间出现变异细胞类型。初生型(或型)菌是由侵染期线虫携带的初始菌细胞,发生变异的细胞型被称为次生型(或型)(Boemare, 2002; Owuama, 2003)。迄今为止,所有已研究的嗜线虫致病杆菌(*X. nematophilus*)菌株型细胞均具有以下特征:可运动,可结合染料,能产生抗生素、溶血素、蛋白酶和晶体蛋白,能在琼脂表面形成鞭毛(Boemare & Alkurst, 1998; Meslet-Cladiere et al, 2004; Sicard et al, 2005)。

致病杆菌和光杆状菌两者的型变存在着重要差异:第一,已报道在光杆状菌中,有中间型的和小型的两种变异,而在致病杆菌中一般不会发生这种变异;第二,在致病杆菌中,型可以回复到型,而在光杆状菌中还未见报道;最后,线虫在各自的型细胞上生长的能力是明显不同的,斯氏线虫能在含有型菌的脂质培养基上生长,而异小杆线虫不能在型光杆状菌上生长。当异小杆线虫在含有型和型细胞混合的培养基上生长时,线虫更喜欢摄入型菌。尽管异小杆线虫不能与其共生菌的型菌株共同生长发育,但它却能在一种与其不同品系的发光光杆状菌(*P. luminescens*)型细胞上低水平繁殖(Ehler, 1990)。

1.1.2 型变的可能机理

表型变异的遗传机制是什么?鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)中,由于染色体片断倒位,控制两种不同的表达基因,从而产生两种类型的鞭毛(Bruist & Simon, 1984; Lino & Kutsukake, 1983),链霉菌(*Streptomyces* spp.)表型变异是由于基因缺失或转座子插入,而且扩增的DNA区域可以解释重组后的某些缺失。根瘤菌(*Rhizobium* spp.)存在形态变异使固氮共生特性发生变化,原因是由于不同的冗余DNA之间发生同源重组而造成这些变异。在古生菌中经常发生的DNA重排

与 A+T 富集区域有关。

以上传统的表型变异涉及可逆的遗传事件(如 DNA 的重组或改变),并且是以一定的频率发生。而在昆虫病原线虫共生细菌致病杆菌与发光杆菌中, 型细胞的形成在几个方面传统的表型变异有所不同: 型细胞的形成以一个低的、且不可预测的频率发生;DNA 重组、倒置、重排或质粒的缺失似乎并没有涉及其中。

1.1.2.1 型变并非由质粒丢失引起

昆虫共生细菌型变研究早期,许多科学家认为,质粒或噬菌体的丢失可能是型变发生的原因,但已有几个理由对其加以否定:首先,现在已清楚某些致病杆菌 型菌能以一定的频率变回到 型菌;第二,在致病杆菌 型和 型细胞间没有看到质粒的差异;在发光光杆状菌(*P. luminescens*)中,两型细胞在培养时均能形成 lux 基因的 mRNA,脂酶和蛋白酶的控制也是在翻译后水平上进行的,表明没有任何遗传物质的丢失。Leclerc 和 Boemare (1991)对嗜线虫致病杆菌(*X. nematophilus*)三个菌株(A24, F1, NC116)和一个伯氏致病杆菌(*X. bovienii*)菌株 Dan 的质粒进行了研究,试图判定这些细菌型变是否与质粒相关联。结果发现 A24 和 F1 菌株的两型细胞中质粒模式相同,而 NC116 菌株两型各有 1 条带。三菌株质粒消化处理后在两型细胞之间没有差异;菌株 Dan 两型细胞中均未检测出质粒。这些研究结果表明,型变过程中,既没有质粒含量的差异,也没有发生质粒在染色体上重组。

1.1.2.2 型变并非由DNA重排引起

解释型变的另一种可能机制是一些主要的 DNA 发生了重排。Akhurst (1992) 等对致病杆菌的 型和 型菌进行了大量的 RFLP 分析,结果在所研究的 型菌中未发现有任何的 DNA 重排。

Wang & Dowds (1993) 发现发光致病杆菌(*X. luminescens*)两种型态细胞中脂肪酶基因(lip-1)结构相同,转录位点相同,均位于翻译起始位点上游 169bp。Northern 杂交结果表明,两型细胞脂肪酶转录程度相同,分泌的蛋白相同,暗示脂肪酶基因表达是翻译后调控的。但这种调控是由于蛋白质加工、修饰、折叠引起的,还是因为低分子量抑制剂结合到 型细胞的酶所产生,目前尚不清楚。

Givaudan 等 (1996)在不具鞭毛的 *E. coli* 中用功能补偿方法鉴定出嗜线虫致病杆菌(*X. nematophilus*) 型菌含有两个 ORFs 的鞭毛切换位点。序列分析表明第一个 ORF 与编码鞭毛的 fliC 基因对应,与致病杆菌(*Xenorhabdus*) FliC N 端与 C 端之间和其他菌株的鞭毛有很高的同源性。第二个 ORF 方向相反,编码肠细菌相关蛋白 FliD 的同源物。利用致病杆菌(*Xenorhabdus*) fliCD 两个基因可以使 *E. coli* 完全恢复运动性。这两个基因上游均有与 σ_{28} 保守启动子高度同源的序列。fliC 基因结构及其旁侧区域在两种型态中是相同的,但是 Northern 杂交分析表明 fliC 和 fliD 基因在 型细胞中不转录或少量转录。而且,补偿性实验表明 型细胞中加入 型细胞的 fliCD 基因不能恢复运动性,也不能合成鞭毛。这表明致病杆菌(*Xenorhabdus*) 型细胞鞭毛蛋白编码基因属于转录水平的调控。

目前看来,人们对型变的形成和型变的转变都还不甚了解。在发光光杆状菌(*P. luminescens*)中,除了生物发光和脂酶以外,对有关型变的其它各种基因调节或基因产物也几乎一无所知。而已

经研究清楚的生物发光性至少部分是由转录后水平控制的,脂酶是翻译后水平控制的,因此一般认为型变的调控机制是受多水平操作的。

1.1.2.3 型变控制基因的寻找未现端倪

型变控制基因的研究起步较晚且进展不大。Volgyi 等(2000)运用转座子诱变技术从嗜线虫致病杆菌(*X. nematophilus*)分离获得一个由 121 氨基酸残基编码的新蛋白基因(命名为 var1),研究果表明, var1 并不是参与 型细胞形成的唯一基因。

Pinyon 等(2000)为了研究 RecA 是否与型变相关,对伯氏致病杆菌(*X. bovienii*) T228 菌株的 recA 基因进行克隆测序。当在 recA 基因缺失的大肠杆菌中表达时,伯氏致病杆菌 recA 可以补偿 RecA 功能的缺失。伯氏致病杆菌染色体 recA 插入突变显示 UV 的敏感性提高,但并不显示 I 型向 II 型转变的能力,因此作者得出结论:recA 与型变无关。

已经研究,致病杆菌型变中不起作用的基因还有:ompR(Khandelwal & Nirupama, 2003; Kim et al, 2003), rpoS(Vivas et al, 2001)和 pixA(Goetsch, 2006)。

1.1.2.4 型细胞可能是稳定期优势生长突变体

人们推测在细胞中可能有一个主要的开关控制着型变,这个开关应该控制着与型变有关的所有特性,并对所有功能在同一水平(转录、翻译等)上进行调控。但是,正如 Akhurst(1982)所报道的那样,已经发现了一些类似 型菌的中间类型,这些中间类型似乎某些特性发生了改变而另外一些特性却没有。Gerritsen 等(1995)也报道用色素、包含体、发光性、抗生素的产生等特性分离出的一系列发光光杆状菌变型,这些变型都缺乏吸收染料特性,其中两个变型是不稳定的,在培养几天以后又变回了 型。虽然研究表明这些菌株不是真正的 型菌,但是看来所涉及的机制很可能与通常的型变有某种关联。也可能是一种新变型,这种变型可能仅缺少 I 型菌的一种或多种特性,而且更容易回复。在 Krasomil-Osterfeld(1995)的研究中,利用低渗浓度的培养基诱导 型菌的形成,其中的一些已经显示出容易回复到 型。致病杆菌中也发现低频的 型细胞向 型细胞转换(Givaudan et al, 1995)。Keith 等(2002)发现 型和 型培养物中的蛋白质种类在指数期相同,但稳定期却截然不同,表明 型细胞在饥饿条件下起作用。稳定期细胞延长培养提供了筛选许多突变体的条件,可以分离到 型细胞,他们认为 型细胞更可能属于稳定期优势生长突变体[growth-advantage-in-stationary-phase (GASP) mutant],而不是型变变异体(phase variant)。

无论 型细胞是否是自发突变体,已经清楚 型专化的表型是受协同调控的,嗜线虫致病杆菌被许多单一转座子插入诱变而产生了时相转换,表明调节这种表型变异的路径十分复杂(Volgyi et al 2000)。但是并不排除 型细胞类似 GASP 突变体源于突变积累的可能性。Vivas 等(2001)鉴定的嗜线虫致病杆菌(*X. nematophilus*) GASP 突变体对 RpoS 蛋白功能起衰减作用,但其中有一个突变株却不调节 型专化的性状。另外由 Zinser & Kolter(2000)鉴定的 GASP 突变体是由于 lrp 基因的等位基因缺失引起,该基因编码的 DNA 结合蛋白可以作为激活子或抑制子在其中发挥作用。

1.1.3 型变的意义

Forst 认为 型细胞代表着在线虫体外生存的一种形式。确切地说,如果各种次生代谢不消耗细

胞能量,那么在共生以外的生境中, II 型菌会被认为比 I 型菌更具竞争力 (Forst & Nealson, 1996)。Smigieliski 等 (1994) 指出 II 型细胞具有更高的呼吸酶活性, 并且能更快地合成脯氨酸, 他们认为 II 型菌可能更适合在共生之外的生境中生存。在特定的培养基上 II 型菌比 I 型菌长得更快的事实也支持这一观点。他们研究了两型菌对饥饿反应的差异, II 型在恢复营养后 2~4 h 就开始生长, 而 I 型在 14 h 才生长。所以他们推测, 如果共生菌不和昆虫体外的其它微生物竞争的话, 由于 II 型菌具有较短的延迟期所以会更有利于生长。已经从人的伤口中分离出一种自由生活的光杆状菌——*P. asymbiotica*, 该菌缺乏 II 型菌特有的几种特性, 有可能以自由生活状态存在于土壤中。而且, 一些人认为也许 II 型菌在土壤或其他环境中是普遍存在的, 只是由于鉴别的常用方法是依靠那些只有在 I 型菌中强烈表现的特征, 所以往往使 II 型菌很容易被遗漏了。因此如果使用特定的基因探针, 如 lux 基因、脂酶基因、色素基因等进行菌落杂交, 也许是解决这一问题的方法 (Xu et al, 1991; Volgyi, 1998; Daborn et al, 2001; Marokhazi, 2003)。

1.2 致病杆菌分子生物学研究技术

基因工程即 DNA 重组技术是把带有所需要性状的基因插入缺乏这种性状的有机体中, 以改变生物的品质。虽然这方面的研究已经进行了三十多年, 但对昆虫病原线虫共生细菌而言, 基因重组的工作则刚刚起步。特别是致病杆菌, 由于其固有的脆弱性, 使对该细菌的分子生物学研究在技术上受到严重的制约。

1.2.1 电击转化法

在天然条件下尚未鉴定出能自主生活的致病杆菌, 因此这些细菌在普通实验室条件下十分脆弱。例如, 稀释平板计数得到的菌落数显著低于显微镜细胞计数观察的数目。改进平板计数低效率方法以后, 例如在暗光条件下制备和贮存琼脂培养皿、生长培养基中添加过氧化氢酶或丙酮酸盐、将细菌在合适的生长培养基中加以稀释、以及使用温和的铺板方法, 均可以得到较好的结果 (Xu & Hurlbert, 1990; Linda & Mansel, 2003)。

嗜线虫致病杆菌 (*X. nematophilus*) 耐受渗透压变化的能力较差, 营养肉汤中生长缓慢。加入渗透剂如 5% 蔗糖可刺激生长, 但如果细胞重悬于 10% 蔗糖缓冲液中会发生降解现象。相反, 大肠杆菌在加有 20% 蔗糖的营养肉汤中生长速率加倍, 重悬于缓冲液中也不会降解。致病杆菌的这种脆弱性使其难以用电穿孔法进行质粒转化, 迄今为止, 虽然人们尝试了许多条件的电击穿孔法, 但一直未能转化成功 (Forst & Nealson, 1996)。

1.2.2 化学转化法

嗜线虫致病杆菌 (*X. nematophilus*) 可能有一套限制修饰系统影响不同质粒的转化效率, 有人发现嗜线虫致病杆菌染色体 DNA 难以被几种常见的限制酶消化。Xu 等 (1989) 证明嗜线虫致病杆菌 (*X. nematophilus*) ATCC19061 细胞经二甲亚砜处理后可得到约 10^5 - 10^6 转化子/ug pHK17 的转化率。相反, 如果 pHK17 是从大肠杆菌中提取而来, 则转化率将降低超过 250 倍。同理报道中还指出, 虽然

模式菌株 ATCC 19061 能有效地转化, 但同样用二甲亚砜处理嗜线虫致病杆菌 (*X. nematophilus*) 另一菌株 IM/1, 转化却不成功, 原因尚不清楚。

1.2.3 接合转移法

目前将质粒转入致病杆菌细胞的最可靠方法是用大肠杆菌接合转移, 这种方法已将几种质粒转入受体菌株中, 有效且重复性好。已经发现几种常见的可接合转移的载体能从供体细胞 (如大肠杆菌) 转入致病杆菌菌株。

Xu 等 (1991) 将具有不同复制起点的含 Tn5 转座子的质粒从 *E.coli* 接合转移到嗜线虫致病杆菌 (*X. nematophilus*) ATCC 19061, 其中一种质粒 pGS9 产生嗜线虫致病杆菌 (*X. nematophilus*) ATCC 19061 的 Tn5 插入突变体。他们首次分离出 250 多个嗜线虫致病杆菌的突变菌株, 让人最感兴趣的是分离出 3 个不能杀死 *G. mellonella* 的无毒菌株。无毒菌株不运动、溶血性低, 另外野生菌株中占优势的 32.5kDa 蛋白发生缺失。他们还用类似方法使嗜线虫致病杆菌 (*X. nematophilus*) 的 *envZ* 基因插入失活。

Francis 等 (1993) 使用接合转移方法建立了波氏致病杆菌 (*X. bovienii*) 的 λ 传递系统。该菌缺失一个 λ 功能受体 (LamB), 所以 λ 噬菌体不能繁殖。实验中将含有 lamB 的质粒转入 *X. bovienii* T228 可使 LamB 蛋白在细菌表面进行组成性表达。用带有 Tn10 转座子的 λ 噬菌体颗粒转染 *X. bovienii*/pTROY9, 从而得到许多营养缺陷型突变体、溶血突变体、染料结合突变体、Dnase 突变体、蛋白酶突变体和脂肪酶突变体, 突变频率为 0.05-0.9% 不等。

借助接合转移, Pinyon 等 (1996) 利用 Tn5 衍生物构建了波氏致病杆菌 (*X. bovienii*) T228/1 的许多稳定的插入突变体。分离的突变体改变了表达刚果红结合能力、氨苄青霉素抗性、溶血活性和卵磷脂酶活性, 卵磷脂酶活性发生变化。有些突变体失去了产生该酶的能力, 有些表达有所降低。而野生亲本的 LD₅₀ 值显著要低于卵磷脂酶突变体。

Eric 等 (2003) 利用 *E. coli* S17-1 λ pir 将质粒接合转入嗜线虫致病杆菌 (*X. nematophilus*), 经过氯霉素筛选, 构建的嗜线虫致病杆菌菌株能够组成型表达发绿荧光蛋白。

比较而言, 另一昆虫病原线虫共生细菌, 光杆状菌 (*Photorhabdus* spp.) 的操作难度要小一些。光杆状菌细胞脆性不大, 重悬于缓冲液中也不易被溶解, 电击法可以得到 10^4 转化子/ug pBR322 的转化率。同时, 用改进的 CaCl₂-RbCl₂ 法, 按标准的转化方法即可将几种质粒转入到光杆状菌细胞中去。

1.3 致病杆菌功能基因研究进展

昆虫病原线虫共生细菌分子生物学研究除了型变外, 大多集中在致病性、共生作用、生物发光以及对极端环境的适应等机理和功能上, 因此大多基因都涉及这些功能的特性。但是比较而言, 对致病杆菌 (*Xenorhabdus* spp.) 的研究要晚于光杆状菌 (*Photorhabdus* spp.)。从已有的报道来看, 16S RNA 编码基因在该细菌中研究得最早也最为普遍, 在致病杆菌属细菌的分子分类学中起到了相当重

要的作用。而真正致病杆菌功能基因的分子生物学研究,应从上世纪九十年代后期开始。短短的十来年,人们对致病杆菌功能基因的研究重点从外膜蛋白基因和菌毛蛋白基因开始,以后逐渐到共生作用相关基因,近几年研究热点又体现在杀虫毒素基因上。克隆的致病杆菌基因易于在大肠杆菌中鉴定,因为他们和光杆状菌相关基因一样,均可在大肠杆菌表达自身启动子,产生有活性的基因产物,并且其分泌信号可为克隆受体所识别。

1.3.1 外膜蛋白基因

在大肠杆菌中组氨酸激酶信号蛋白 EnvZ 经过自身磷酸化后可以使调节蛋白 OmpR 发生磷酸化。OmpR 磷酸化水平的调节可以控制 ompF 和 ompC 的差异表达。虽然对 EnvZ 和 OmpR 之间的磷酸转化已有深入研究,但 EnvZ 的信号传导功能还研究得不够清楚。Tabatabai 和 Forst (1995) 用比较方法研究了 EnvZ 的信号传导功能。他们发现嗜线虫致病杆菌(*X. nematophila*) 含有编码 ompR 和 envZ 的操纵子。核苷酸序列分析表明, EnvX.n 含有 342 个氨基酸残基,比大肠杆菌 EnvZ 少 108 个。氨基酸序列比较显示 EnvZ 分子的胞质结构域之间有 57% 同源性。相反, EnvZE.c 的亲水性周质结构域在 EnvZX.n 中缺失,而代之以短小的疏水区。虽然 envZX.n 的周质区域分化较大,但是可以补偿大肠杆菌的 δ envZ 的功能。OmpF 和 OmpC 发生差异表达,以应对培养基渗透压的变化。进一步的遗传分析表明, EnvZX.n 和 OmpRE.c 之间的异源磷酸化作用可以解释大肠杆菌的 δ envZ 基因的补偿作用。而且他们发现嗜线虫致病杆菌和大肠杆菌的 OmpR 分子具有 78% 的氨基酸同源性。这些结果表明嗜线虫致病杆菌的 EnvZ 蛋白可以感受到生长环境中的渗透压变化,并正确调节大肠杆菌中的 OmpR 磷酸化水平。

Forst 等(1995) 研究了共生/致病菌嗜线虫致病杆菌 OmpP 的功能和重新调节。纯化的 OmpP 体外孔道功能分析表明其单通道电导值与大肠杆菌的 porin 蛋白 OmpF 相似。核苷酸序列分析显示成熟的 OmpP 蛋白含 348 个氨基酸残基,与 OmpF 有 55% 序列相似性。与 ompF 相似, ompP 位于 asnS 和 aspC 之间。16 个跨膜 β 折叠机构和内环 3 高度保守,而其他的外环结构域则差异较大。引物延伸实验鉴定了 ompP 的转录起始位点,在 ompP 上游发现一个 δ 70 启动子,一个完整的 20bp OmpR 结合位点,以及一个反义分子 micF RNA 的结合位点(Forst, 1997)。

1.3.2 菌毛蛋白基因

致病杆菌的运动主要通过鞭毛来完成。Givaudan 等(1996)从 *X. nematophilus* F1 菌株中鉴定到一个位点含有两个 ORFs, 序列分析表明第一个 ORF 对应编码鞭毛蛋白的 fliC 基因,第二个与肠细菌钩状相关蛋白(FliD)具有同源性。*Xenorhabdus* fliCD 基因对于恢复大肠杆菌运动性是必需的, fliC 基因及其周围结构在两型细胞中都是相同的,但 Northern 杂交 fliC 和 fliD 在 II 型细胞中不转录或微弱转录。互补实验表明,将 I 型细胞的 fliCD 转到 II 型细胞中,II 型细胞的运动型和鞭毛合成也不能回复。这表明鞭毛调节子的转录级别(transcriptional hierarchy)要高些,所以在 II 型细胞中关闭了。该实验室继续构建了 *X. nematophilus* F1 菌株的 flhD 缺失突变体,表明 flhDC 操纵子控制鞭毛的表达,而且脂肪水解和胞外溶血素活性都是依赖 flhDC 的。同时 flhD 缺失突变体在斜纹夜蛾

(*spodoptera littoralis*) 中的毒性比野生型弱。这表明, flhDC 操纵子在侵染昆虫的过程中具有运动、脂肪酶、溶血素功能或者其他未知的功能 (Givaudan & Lanois, 2000)。

为了了解 *Xenorhabdus* 独特的生命周期中伞毛的作用, He 等 (2004) 分析了 mrx 操纵子的结构和表达。Mrx 操纵子只含有 5 个结构基因 (mrxACDGH), 是目前为止所研究的最小的分子伴侣引导的 fimbrial 操纵子之一。不像奇异变形菌 (*Proteus mirabilis*) 的 mrp 操纵子, 致病杆菌的 mrx 操纵子与位点特异重组酶无关。在最大的伞毛基因 (mrxA) 和引导基因 (mrxC) 之间区域缺失类似 mrpB 的基因, 而 mrxA 下游含有三个串联反向重复序列。琼脂生长的细胞中, 主要转录含有长为 940 nt 的 mrxA 的 mRNA, 而 mrx 多顺反子 mRNA 只低水平转录。mrxA 上游有一个典型的 sigma (70) 启动子, 没有出现倒置现象。lrp 突变菌株不产生伞毛, 表明亮氨酸应答调节蛋白 Lrp 在调节 mrx 操纵子中发挥作用。这些结果表明 mrx 操纵子的遗传结构和调节在某些方面与其他分子伴侣引导的伞毛操纵子是截然不同的。

Khandelwal 等 (2004) 首次报道细菌中伞毛蛋白亚基的杀虫活性。他们对嗜线虫致病杆菌蛋白质复合物提取的 17 kDa 伞毛蛋白亚基进行了克隆、表达和鉴定。实验通过 PCR 扩增, 克隆并在大肠杆菌中表达。体外没有同源的分子伴侣, 重组蛋白用尿素梯度重折叠, 寡聚化的蛋白在体外重折叠, 形成多聚体。伞毛蛋白保守性 N-末端残基的点突变时寡聚结构稳定性大大降低, 表明 N 末端在伞毛蛋白亚基在重折叠和寡聚化的重要性。重组蛋白对棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 幼虫血细胞具有细胞毒性, 引起凝集反应, 并伴随细胞质中乳糖脱氢酶的释放。

1.3.3 共生作用相关基因

在大多革兰氏阴性细菌中, δ (S) 转录因子控制逆境抗性、存活或与寄主互作的调节子。因此, Vivas 和 Goodrich-Blair (2001) 在首次对嗜线虫致病杆菌 (*X. nematophila*) 共生分子机制的研究中分析了 δ (S) 转录因子在菌株-线虫互作中的作用。他们对嗜线虫致病杆菌编码 δ (S) 的 rpoS 基因进行克隆测序突变, 结果发现 rpoS 突变体和野生型一样对昆虫有致病性, 但是该突变体不能在线虫中肠中共生。该实验室用 signature-tagged mutagenesis (STM) 技术, 从转座子突变体中筛选得到 15 个突变株, 共有 9 个单独的位点被插入突变。其中 3 个位点的 OPFs 类似编码调节蛋白的基因 (rpoS, rpoE, lrp); 两个位点的 ORFs 类似编码氨基酸生物合成酶的基因 (aroA, serC), 一个位点的 ORFs 命名 nilB (nematode intestine localization), 含有的一个 ORF 与奈瑟氏球菌 (*Neisseria*) 中推测的外膜蛋白 (OmpU) 有相似性; 而含有的另 3 个基因 (nilA, nilC 和 nilB) 却在数据库中没有同源性。nilA, nilC 和 nilB 在一个 4kb 位点上连锁, nilB 和 nilC 使定殖线虫能力降低了至少 104 倍, 推测编码位于膜上蛋白。NilD 位点含有广泛重复区域以及一些小的 ORFs (Heungens et al, 2002)。他们进一步的研究表明: 嗜线虫致病杆菌在线虫中定殖需要 isc-hsc-fdx 位点的协调表达。嗜线虫致病杆菌中预测编码铁硫组合体的 iscRSUA-hscBA-fdx 位点的 iscA 和 hscB 之间插入, 阻止了在小卷蛾斯氏线虫 (*S. carpocapsae*) 中定殖。这种插入破坏了 iscA 和 hscB 基因的共转录, 但并不降低 hscBA 表达 (Martens et al, 2003)。

Orchard 和 Goodrich-Blair (2004) 首次报道了寡肽转运在无脊椎动物-细菌互作中的作用, 他们研究了寡肽摄入对嗜线虫致病杆菌实验室生长和寄主环境共生的重要性。实验中鉴定了嗜线虫致病

杆菌寡肽透过酶(oligopeptide permease)操纵子,该操纵子负责两个连续的编码寡肽结合蛋白的 oppA 基因,以及推测的透过酶编码基因 oppB, oppC, oppD 和 oppF。多肽饲喂实验表明, opp 操纵子编码功能性的寡肽透过酶。试验中分别构建了 oppA(1), oppA(2)和 oppB 的突变体,检测了这些突变体在富含多肽的培养基以及线虫寄主中的生长能力。结果发现 opp 突变体菌株无论在培养基中,还是在幼虫血淋巴中,其生长表型均发生了变化,但是 opp 突变体依然能够启动并维持与寄主的共生作用且具有昆虫致病性(Martens & Goodrich-Blair, 2005)。

1.3.4 溶血素相关基因

溶血素相关基因研究是近几年才开始开展的。Brillard 等(2003)筛选了嗜线虫致病杆菌 DNA 文库,对一个 5.7kb 位点进行鉴定,该位点克隆于大肠杆菌中后会引起溶血现象,但在大肠杆菌 sheA 缺失突变体中不表现。该位点与 λ 噬菌体的裂解基因同源,而且,它编码的功能性 holin 能够补偿 λ Sam7 突变体的功能。

Cowles 和 Goodrich-Blair(2005)研究表明,嗜线虫致病杆菌溶血素 XhlA 对烟草天蛾(*Manduca sexta*)幼虫完全毒性是必需的。Lrp(亮氨酸应答调节蛋白, leucine-responsive regulatory protein)、FlhDC(regulator of flagella synthesis)、二价铁限制都正调控 xhlA 的转录,表明 XhlA 表达与影响获得和运动调节子是相关联的。为了理解 XhlA 在毒性中的作用,他们在研究其细胞中的靶位时发现 XhlA 是一种细胞表面的溶血素,可以降解昆虫的两种主要免疫细胞(粒性白细胞和浆血细胞 plasmatocytes)以及兔子和马红细胞,而且, xhlA 是菌株完整毒性所必需的。hcp(haemolysin co-regulated protein)是紧邻 xhlA 位点上游的基因,在三价铁限制时其转录水平上升,而且 hcp 的表达依赖 Lrp。

1.3.5 杀虫毒素蛋白基因

杀虫毒素基因在致病杆菌的分子生物学研究中进行得最为深入,而且已经取得了巨大进展。英国科学家 Morgan 等(2001)利用柯氏质粒(cHRIM1)对嗜线虫致病杆菌(*X. nematophilus*)PMFI296 菌株基因组文库进行研究,发现 5 个基因(xptA1,-A2,-B1,-C1,-D1)与 *P. luminescens* 杀虫毒素有高达 49%的同源相似性,而且一个稍小的基因(chi)与推测的几丁酶基因有 38%相似性。转座子诱变插入表明基因 xptA2,xptD1,chi 对欧洲粉蝶(*Pieris brassicae*)杀虫活性的表达并不重要,而 xptA1 在活性表达中起中枢作用,完整的活性还需要 xptB1 和 xptC1 基因。这些基因在染色体上分布在一起,因此表现在一个单一的柯氏质粒插入体上。虽然完整活性需要多基因,但由 λ PL 启动 xptA1 基因在 *E.coli* 中也具有杀虫活性。这与 *P. luminescens* 中鉴定的毒素基因不同,后者的基因在 *E.coli* 中各自表达时无杀虫活性。这些毒素基因和几丁酶基因的定位以及 cHRIM1 中的可移动因子(插入序列)和 tRNA 基因的存在表明:这些 DNA 区域是 *X. nematophilus* PMFI296 基因组的致病岛。*X. nematophilus* 基因与远缘菌株 *P. luminescens* 具有同源相似性,表明与线虫共生的细菌含有一套共同的昆虫毒素。这些菌株从共同祖先分化出来时就有这些基因,使他们能完成类似功能;或者这些菌株之间或者菌株与尚未鉴定的菌株之间发生了基因交换。

该实验室于 2003 年还首次报道致病杆菌杀虫毒素的特性,他们在 *E.coli* 中分别表达了四个 xpt 基因: xptA1(tcdA/sepA-like;7841bp;预测蛋白 287kDa), xptA2(tcdA /sepA-like; 7647bp; 预测蛋白 285kDa), xptB1(tccC/sepC-like;3047bp;预测蛋白 111 k Da), xptC1 (tcdB/sepA-like; 4256bp;预测蛋白 160kDa), 而且还研究了这些基因的不同组合在对不同昆虫种类的活性表达中的作用。结果显示, xptB1 和 xptC1 基因在不同细胞中分别表达时不能表现杀虫活性,即二者需要在同一细胞中同时表达; xptA1 和 xptA2 基因显示不同的杀虫活性谱,但它们均需要 xptB1 和 xptC1 基因产物以产生全部的杀虫活性;基因 xptA2, xptC1,和 xptB1 在嗜线虫致病杆菌 (*X. nematophila*) PMFI296 中以一个多顺反子转录体的形式表达。基因 xptA2 和 xptC1 失活会使下游基因沉默,而基因 xptA1 却以单基因表达,因此,这些基因的排列方式显示出更为进化的结构。长久以来这些远距离可移动的基因能够发生相互作用,这样有利细胞产生杀虫毒性。这些基因通过大量的整合作用,而形成了一个紧密完整的单元 (Sergeant et al, 2003)。

国内中山大学崔龙等用原位杂交法从嗜线虫致病杆菌 (*X. nematophila*) BP 菌株粘粒文库的 500 个克隆中筛选出 5 个阳性克隆,分别命名为 XnBP76, XnBP83, XnBP203, XnBP378, XnBP414。通过 PCR 鉴定, XnBP83 包含 *X. nematophila* PMFI296 菌株的全部杀虫毒素基因,其基因大小与之基本相同,序列同源性在 93%以上。进一步对 *X. nematophila* BP 杀虫毒素基因簇中各 ORF 与对棉铃虫口服毒性的关系研究发现, xptC1 和 xptA2 两个基因中缺少任何一个都会使口服毒性大幅度下降或完全消失,而缺少 xptD1 和 xptA1 对杀虫活力影响很小。xptA2 的单独表达产物具有口服毒性,但与多基因的联合表达产物相比,其杀虫活性明显降低 (崔龙等, 2003a, 2003b)。本实验室刘峥利用特异引物从杀虫活性不同的 4 个嗜线虫致病杆菌菌株 (CB6、CB33、CB43 和 CB54) 中扩增得到了杀虫基因片段 cb6A1、cb33A1、cb43A1 和 cb54A1,它们的核苷酸序列具有高度的同源性。构建了嗜线虫致病杆菌北京变种杀虫蛋白基因片段 cb6A1 的非融合表达载体 pBV221-cb6A1-1 和融合表达载体 pGEX-KG-CB6A1-2,并在大肠杆菌中获得了表达,用含有非融合表达蛋白的饲料 (20 μ g 重组蛋白/g 饲料) 饲喂棉铃虫初孵幼虫,3 天后幼虫死亡率为 91.67%,证明 cbA1 杀虫蛋白基因片段在大肠杆菌中的表达蛋白具有一定的杀虫活性 (刘峥, 2003)。

最近有人从 *X. nematophila* 中鉴定到一个新的 42 kDa 蛋白,可杀死 *Galleria mellonella* 和棉铃虫 (*H. armigera*) 等昆虫幼虫,注射剂量分别为 30 和 40 ng/g 幼虫。重组毒素蛋白对许多昆虫都具有直接注射活性。尽管也发现脂肪体也有所破坏,但毒素的原初作用位点是中肠 (Brown et al, 2004; Brown et al, 2006)。

1.3.6 专利保护基因

近几年,随着对致病杆菌研究的深入,相关基因特别是杀虫毒素基因的专利申请越来越引起人们的重视。Smigielski 等 (1999) 最早对嗜线虫致病杆菌 6 个毒素基因提出申请, Morgan 拥有 4 个杀虫剂基因和 1 个线虫控制基因专利 (Morgan et al, 2000a, 2000b), East (2003) 的专利涉及嗜线虫致病杆菌和发光杆状菌的 20 个毒素基因, Hey 等 (2004) 从伯氏致病杆菌中获得 13 个杀虫毒素晶体蛋白基因专利, Bintrim 等 (2004) 拥有 9 个致病杆菌杀虫毒素晶体蛋白基因。无疑这些基因专利对致病杆菌从基础理论研究到实际运用都将起到极大的推动作用。

1.3.7 功能未知基因

Goetsch 等 (2006) 对嗜线虫致病杆菌 PixA 包涵体蛋白进行了研究, 该蛋白有 185 个氨基酸残基, 富含蛋氨酸, 其表达不需要 RpoS。利用 pixA 突变菌株进行实验, 结果表明 Pix 对于杀虫毒性、细菌在线虫寄主中的定殖或存活都不是必需的, 对线虫繁殖也不必需。pixA 基因在伯氏致病杆菌 (*X. bovienii*) 基因组中不出现, 说明 PixA 是嗜线虫致病杆菌 (*X. nematophila*) 所专化产生的。但是其明确的功能尚不清楚。

1.4 致病杆菌抗菌代谢产物研究进展

1.4.1 致病杆菌抗菌代谢物的抑菌活性

早在 1959 年就有报道指出, 昆虫病原线虫共生细菌能分泌抗菌活性物质 (Dutky, 1959)。进一步的研究发现, 共生菌在代谢过程中可产生多种抗生素类物质, 产生抗菌素是共生菌的普遍特征 (Akhurst, 1982; Paul et al, 1981; Akhurst & Boemare, 1988; McInerney et al, 1991a; Isaacson & Webster, 2002)。这些代谢产物对多种细菌有一定的抑制作用 (McInerney et al, 1991b; Webster & John, 1999; Thaler, 2002; Poinar & Thomas, 1966; Dunphy, 1994)。Akhurst 报道了共生菌 *Xenorhabdus* spp. 的初生型代谢产物对藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 等的抑制作用 (表 1-1)。

表 1-1 致病杆菌属细菌的抑菌谱

Table 1-1 The inhibitory activities of *Xenorhabdus* spp. against bacterium

细 菌	致病杆菌株系					
	A24	T319	Q58	G1	Q1	K
藤黄微球菌 <i>Micrococcus luteus</i>	+	+	+	-	+	+
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	-	+	+
蜡状芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	-	+	+
多粘芽孢杆菌 <i>B. Polymyxa</i>	+	+	+	-	+	+
枯草芽孢杆菌 <i>B. Subtilis</i>	+	+	+	-	+	+
苏云金杆菌 <i>B. thuringiensis</i>	+	+	+	-	+	+
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-	+	+
沙雷氏菌 <i>Serratia</i> sp.	+	+	+	-	+	+
普通变形杆菌 <i>Proteus vulgaris</i>	-	+	-	-	-	-
荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	-	-	-	-
软腐欧文氏菌 <i>Erwinia carotovora</i>	+	+	+	-	+	+
索氏志贺氏菌 <i>Shigella sonnei</i>	+	+	-	-	+	+

注: (-) 无抑菌作用, (+) 有抑菌作用

Chen 等 (1994) 研究发现致病杆菌属中的 2 种线虫共生菌发酵液对 32 种真菌种的 7 种植物病原真菌均具有良好的抑菌效果。Li 等 (1995) 从伯氏致病杆菌 (*X. bovienii*) 的发酵液中分离到吡啶和二硫吡咯衍生物, 在平板上 50-100ug/ml 的浓度下即可抑制致病疫霉 (*Phytophthora infestans*) 菌丝的生长, 且对不同生理小种均有抑菌活性。Ng 和 Webster (1997) 的研究也表明, 这两种化合物在 5.0 mg/ml 的浓度下, 能减轻盆栽马铃薯晚疫病病害 24%; 在田间 10 mg/ml 使用 7 天后, 能明显抑制枯叶的继续发展。Lopez 等 (1997) 测定了斯氏线虫与致病杆菌共生体对甜菜幼苗猝倒病的防治效果, 结果表明可显著减轻发病率。

本实验室率先在国内开展了利用致病杆菌代谢物抑制植物疫病的研究, 并取得了显著效果。研究结果表明嗜线虫致病杆菌 (*X. nematophilus*) 发酵液对 9 种病原细菌和植物病原真菌的抑制作用, 其中对疫霉属的植物病原菌抑制作用最强 (表 1-2)。发酵液为 6-50 ml/L 时对马铃薯叶片晚疫病菌丝生长抑制达 90-100%; 发酵液为 100ml/L 时对离体马铃薯叶片晚疫病菌的发病和病害发生有较强的控制作用, 处理后 7 天控制病害分别达 93.08 和 100%。用 50 ml/L 的发酵液作为保护剂处理盆栽植株叶片, 7 天后对晚疫病病害控制率平均达 75.9%, 与 20 ml/L 的 25% 甲霜灵效果没有显著差异; 另外, 发酵液对大豆疫霉菌、白菜软腐病菌、水稻白叶枯病菌等都有很好的抑菌效果 (杨秀芬 等, 1998a, 1998b; 杨怀文 等, 2000; 杨秀芬 等, 2002)。

表 1-2 致病杆菌属 (*Xenorhabdus* spp.) 对植物病原真菌的抑制效果

Table1-2 The effects of *Xenorhabdus* spp. inhibition against plant pathogenic epiphyte

病原真菌	A24	BJ	CB-19	NC116	NC32
番茄早疫病菌 (<i>Alternaria solani</i>)	++	+++	+	+	++
苹果轮纹病菌 (<i>Physalospora piricola</i>)	++	-	++	-	-
苹果腐烂病菌 (<i>Vaisa mali</i>)	+	-	-	+	-
苹果干腐病菌 (<i>Botryosphaeria ribis</i>)	++	++	+	++	+
小麦赤霉病菌 (<i>Fusarium graminearum</i>)	+	-	-	-	-
小麦根腐病菌 (<i>Helminthosporium sativum</i>)	++	+++	-	+++	++
柑橘黑腐病菌 (<i>Alternaria citri</i>)	+	-	+	+	-
黄瓜疫霉病菌 (<i>Phytophthora melonis</i>)	++++	++++	++	N	+++
棉花疫霉病菌 (<i>P. beohmeriae</i>)	++++	++++	++	N	+++

注: (-) 无抑菌作用, (+) 有抑菌作用, (++) 菌落为对照的 1/2, (+++) 菌落为对照的 1/3, (++++) 菌落为对照的 1/4 (N) 未测定

1.4.2 致病杆菌的抗菌代谢物质

致病杆菌来源于特殊的生境, 其代谢物中存在多种具有生物活性的新化合物。因此, 在 80 年代

末 90 年代初,国外科学家开始热衷于从生态多样性的昆虫病原线虫体内分离、筛选具有特异生物活性的菌株,希望从其代谢物中发现新结构物质并进行开发利用。国内本实验室已从嗜线虫致病杆菌北京变种(*X. nematophila* var. *pekingensis*)中分离鉴定到吡啶类和苯并吡喃类抗生素活性物质。到目前为止,已相继分离鉴定了多种具有生物活性的组分,主要包括以下几类(图 1-1, 表 1-3):

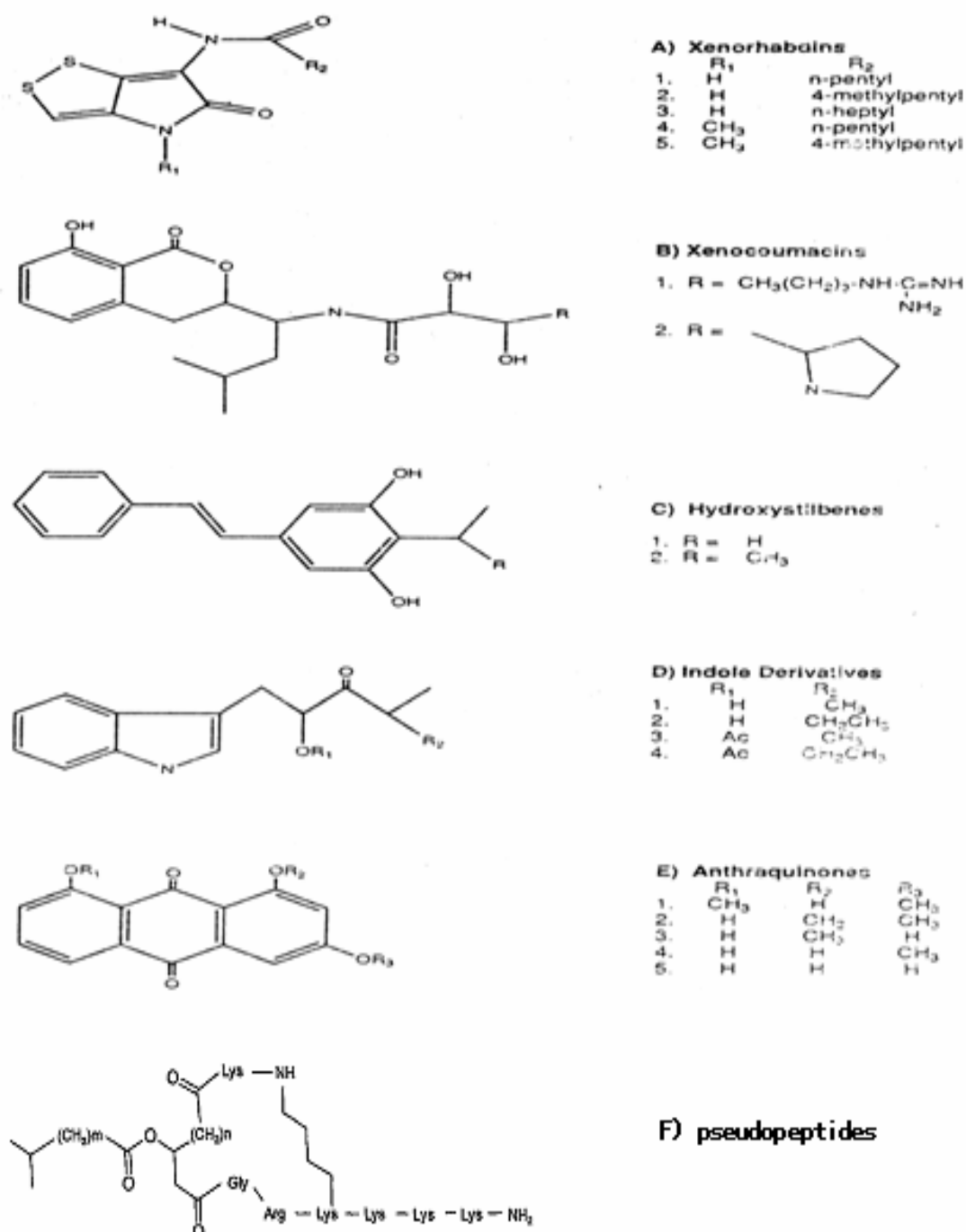


图1-1 致病杆菌产生抑菌物质的化学结构

Fig 1-1 The chemical structure of antibiotic metabolites from *Xenorhabdus* spp

表 1-3 致病杆菌中分离鉴定的抑菌代谢物

Table1-3 The antibiotic metabolites from genus *Xenorhabdus*

共生菌种类	株系	产生的抑菌物质
<i>X. nematophilus</i>	ALL	苯并吡喃类(异香豆素)
	A24	苯并吡喃类、细菌素
	F1	细菌素
	ATC	几丁质酶
	D1、BC1	几丁质酶
	F1	假肽类
	T319	二硫吡咯类
	Umea	二硫吡咯类
<i>X. bovienii</i>	Dan	细菌素
	R	吲哚类
	A21	几丁质酶
<i>X. beddingii</i>	Q58	细菌素
		假肽类
<i>Xenorhabdus sp.</i>	Q1	二硫吡咯类、苯并吡喃类、假肽类

1) 二硫吡咯类衍生物

该类抑菌物对 G^+ 作用强, 对 G^- 作用较弱。从不同的共生菌菌株中分离得到的抑菌物结构也不尽相同。该类物质对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 6538P)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus* BTA 433)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus* BTA 432)、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes* IMR-RNSH)具有较强的抑制效果, 且对细点突夜蛾(*Heliothis punctigera*)有抑制生长和杀死作用(Rhodes et al, 1987; Li et al, 1997)。

2) 苯并吡喃类(又称异香豆素)

水溶性抗生素, 对以下细菌有抑制作用: 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* V573、*Staphylococcus aureus* CN10)、大肠杆菌(*Escherichia coli* ESS)、鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii* BRL 2400)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium* NCIB 9376)、干燥棒杆菌(*Corynebacterium xerosis* NCTC 9755)、藤黄八叠球菌(*Sarcina lutea* ATCC 8740); 对真菌酵母(*Cryptococcus neoformans*) $EC_{50}=0.125 \mu\text{g/ml}$, 对黑曲霉(*Aspergillus niger*)的 $EC_{50}=10\mu\text{g/ml}$, 对 *Trichophyton mentagrophytes* 的 $EC_{50}=2\sim 8 \mu\text{g/ml}$ 。另外 10 mg/ml 对小鼠胃溃疡有治疗作用(McInerney et al, 1991; Ji et al, 2004)。

3) 羟化 1,2-二苯乙烯类衍生物。

该物质作用机制是通过刺激核苷酸 ppGpp 的合成积累, 以抑制 RNA 的合成(Richardson et al, 1988)。

4) 吲哚类衍生物

Valerie 等(1981)首先报道该类物质通过色氨酸降解途径合成, 这类抑菌物的作用机制是通过增加核苷酸 ppGpp 的合成, 抑制 G^- 和 G^+ 的 RNA 的合成, 对致病疫霉(*Phytophthora infestans*)有显著的抑制活性(Valerie et al, 1981; Li et al, 1995; Li et al, 1997; Pan et al, 2002)。

5) 蒽醌类色素

色素类抑菌物, 主要具有抑制真菌的活性(Sundar & Chang, 1993; Webster et al, 1996)。

6) 假肽类 (Pseudopeptides)

是一类带有氨基酸的小分子化合物, 嗜线虫致病杆菌 (*Xenorhabdus nematophila*) 等代谢产生。在 10 $\mu\text{g/ml}$ -40 $\mu\text{g/ml}$ 对多种真菌、细菌有抑制活性 (Thaler et al, 2002)。

7) 细菌素 (Xenorhabdins)

蛋白类抗生素, 一般条件下, 在 I 型菌和 II 型菌中表达量都很低, 在丝裂霉素 (Mitomycin C) 和高温 (45 $^{\circ}\text{C}$) 诱导下大量产生。诱导处理后菌体溶解, 细胞死亡。抗菌谱窄, 主要抑制亲缘关系较近的其它共生菌的生长 (Boemare et al, 1994; Thaler, 1997; Thaler et al, 1995)。

8) 几丁质酶

致病杆菌能产生几丁质酶, 能抑制真菌菌丝体的生长和分生孢子的萌发 (Webster, 1998; Chen et al, 1996)。

1.5 本研究的立题依据及意义

1.5.1 立题依据

利用物理化学方法或者遗传操作技术, 对抗生素产生菌进行改造, 可以得到产素能力提高、产素水平稳定的高产菌株, 直接进行工厂化生产。已有的研究表明, 嗜线虫致病杆菌北京变种(*X. nematophila* var. *pekingensis*) 代谢产物具有很高的杀虫、抑菌以及抑制癌细胞生长活性(Pan et al, 2002; 刘峥等, 2003; 王立霞等, 2001; 吕秋军等, 2002)。本实验室庞在堂等 (2002) 利用多种理化诱变因素对嗜线虫致病杆菌北京变种进行了诱变处理, 但所筛选到的正突变菌株的遗传很不稳定, 极易发生回复突变, 经连续传代三次之后, 产生抑菌活性物质的水平又恢复到出发菌株。这说明常规诱变育种技术不适合该菌株的遗传改良, 因而探讨该菌株的遗传操作技术, 为利用基因工程技术改良菌株并最终实现菌株的开发利用具有深远的意义。

近年来, 致病杆菌的分子生物学研究报道越来越多, 人们对致病杆菌功能基因的研究重点包括外膜蛋白基因、菌毛蛋白基因、共生作用相关基因、溶血素类似基因和杀虫毒素基因。其中杀虫毒素基因已经取得了相当的进展, 有许多相关基因已经申请了专利。因此致病杆菌分子生物学已经越来越成为研究的热点, 对致病杆菌功能基因的研究尤为必要。

1.5.2 研究目的和意义

本研究通过对嗜线虫致病杆菌北京变种菌株抗生素抗性进行测定, 确定菌株遗传操作的选择标记; 研究不同的转化技术对菌株遗传背景的影响; 将外源质粒转化到菌株中, 建立外源质粒转化体系; 同时测定质粒导入对菌株生理生化特性的影响, 特别是对抗生素产素水平的影响, 进而评价该菌株基因工程改造的可行性。此研究将为嗜线虫致病杆菌北京变种的遗传改良提供重要的技术基础;

致病杆菌外源质粒转化体系的建立将填补我国致病杆菌遗传研究的空白，为该类细菌的遗传操作和基因功能的研究提供技术支持。

由于目前对致病杆菌抗生素生物合成相关基因的研究尚未见报道，本研究借鉴医药研究中发现的抗生素合成基因和抗性基因紧密连锁而且成簇分布的特征，从抗生素抗性特性入手，运用生物信息学方法对嗜线虫致病杆菌北京变种抗生素分子生物学进行研究，探讨抗生素相关基因的克隆、分析、表达与纯化，同时对抗生素抗性基因的起源分布进行探讨。这对嗜线虫致病杆菌北京变种菌株在农业上和医药上的进一步利用具有重要的意义。

第二章 嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株质粒转化体系的研究

嗜线虫致病杆菌能产生多种生物活性组分,主要包括:二硫吡咯类衍生物、苯并吡喃类(又称异香豆素)、羟化 1, 2-二苯乙烯类衍生物、吡啶类衍生物、蒽醌类色素、假肽类、细菌素和几丁质酶。但是在离体培养条件下不稳定的初生型菌易转变为稳定的次生型菌,导致产素能力和活性大幅降低。因此,人们一直期待通过遗传操作,得到高效稳定的工程菌株,实现该菌株抗生素的工业化生产。质粒转化是遗传操作最基本的技术之一,本研究以嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株为材料,首先对其抗生素抗性进行测定,然后比较几种转化技术在菌株中的应用,尝试菌株遗传转化体系的建立,并根据菌株遗传背景的变化对质粒转化技术进行了探讨。

2.1 北京变种的抗生素抗性研究

抗生素是在微生物初级代谢过程中由于特定的分支点受到阻碍而产生的物质,即所谓次级代谢物质。自然界中这种次级代谢物在微生物体内含量少,尚不至于对产生菌构成毒害;但是在抗生素工业生产中,抗生素需大量积累,由于它所积累的产物是一种杀菌剂,这就引出一系列的问题:抗生素产生菌怎样面对自身产物的作用,为什么大多数抗生素物质对产生菌本身没有强烈的代谢干扰作用?他们具有哪些特殊的自身防卫机制?

一般认为抗生素产生菌的自身防卫机制可分成三类:以抗生素的被钝化和修饰而失去与活性靶位结合的能力。在产生菌胞内能与抗生素结合的靶位被修饰的自身防卫机制。抗生素进入细胞的通道被阻碍,即细胞膜通透性的改变。对于一个抗生素的产生菌来讲,具备何种防卫机制无疑是其遗传因素所决定的,但也不能否认环境因素的影响。对某产生菌而言,有可能只具有一种防卫机制,也可能同时具备多种防卫机制(Davies, 1994)。

研究抗生素产生菌自身防卫机制在现代生物学中还有另外一层含义:在细菌基因操作技术中,常常根据宿主细菌的抗生素抗性,选择含有其他抗性的载体,以便于遗传改造的最终筛选。本实验研究了嗜线虫致病杆菌北京变种菌株 I 型细胞的抗生素抗性,为以后菌株转化的质粒载体选择和转化子的筛选奠定技术基础。

2.1.1 实验材料

2.1.1.1 材料

嗜线虫致病杆菌北京变种(*X. nematophila* var. *pekingensis*) I 型菌株由本实验室分离、保存。

2.1.1.2 培养基

NBTA 培养基

营养琼脂	45 g
溴百里酚兰	0.025 g
氯化三苯基四氮唑	0.040 g
蒸馏水	1000 ml

LB 培养基：

胰蛋白胨	10 g
酵母抽提物	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O	1000ml
pH	7.5

2.1.1.3 试剂

抗生素氯霉素、链霉素、新霉素、卡那霉素、氨苄青霉素、青霉素分别购自 Sigma、Gibco、NEB、Merck 公司。

2.1.2 实验方法**2.1.2.1 抗生素浓度梯度的配制**

嗜线虫致病杆菌北京变种对几种抗生素的抗性在含抗生素的 LB 培养基中测定。根据基因操作中各种抗生素常见的使用浓度设立 4 个不同的浓度梯度，依次编号为 1、2、3 和 4。其中氯霉素为 40、20、10 和 5 μ g/ml；新霉素为 30、15、7.5 和 3.75 μ g/ml；卡那霉素为 50、10、5 和 1 μ g/ml；链霉素为 100、10、5 和 1 μ g/ml；青霉素和氨苄青霉素均为 1000、500、100 和 50 μ g/ml。

2.1.2.2 抗生素抗性的测定

1) 将嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌首先接种于含 50ml LB 培养基的 250ml 三角瓶中，28 摇床培养 36h。

2) 6000 rpm 离心 10min，弃上清。

3) 沉淀用等体积的无菌生理盐水悬浮。

4) 6000 rpm 离心 10min，弃上清。

5) 重复步骤 3) 4) 两次。

6) 将菌体用生理盐水重悬，使其终浓度为 10⁷cfu/ml。

7) 取 50 μ l 上述菌液分别接种于 5ml 含有 2.2.1 配制的不同抗生素不同浓度的 LB 培养基中。

8) 28 摇床，180rpm，培养 36~48h，观察结果。

抗生素抗性的判定：培养基变浑浊表示菌液生长，即菌株对该浓度的抗生素具有抗性；反之，培养基变浑浊表示菌株对该浓度的抗生素敏感。试验重复 3 次。

2.1.3 结果与分析

2.1.3.1 氯霉素抗性测定

氯霉素属脂溶性抑菌剂,其作用机理是通过弥散进入细菌细胞内,并可逆地结合在细菌核糖体的 50S 亚基上,使肽链增长受阻,因此抑制了肽链的形成,从而阻止蛋白质的合成。在常规基因操作中氯霉素的使用浓度一般为 20 $\mu\text{g/ml}$ 。从表 2-1 可以看出,嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株不能在含有氯霉素的培养基中繁殖,5 $\mu\text{g/ml}$ 的氯霉素就可以使其生长受到抑制。

表 2-1 嗜线虫致病杆菌北京变种的氯霉素抗性测定

Table 2-1 Analysis of chloramphenicol resistance of *X. nematophila* var. *pekingensis*

浓度 (Concentration)	菌株生长情况 (Strain growth status)
40 $\mu\text{g/ml}$	-
20 $\mu\text{g/ml}$	-
10 $\mu\text{g/ml}$	-
5 $\mu\text{g/ml}$	-

注: + 生长 - 不生长

2.1.3.2 卡那霉素抗性测定

卡那霉素是一种氨基糖肽类抗生素,作为高效广谱细菌抑制剂,其作用机理是通过与敏感宿主的核糖体结合而使蛋白质合成受阻。在常规基因操作中卡那霉素的使用浓度一般为 25 $\mu\text{g/ml}$ 。从表 2-2 可以看出,嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株不能在含有氯霉素的培养基中生长。

表 2-2 嗜线虫致病杆菌北京变种的卡那霉素抗性测定

Table 2-2 Analysis of kanamycin resistance of *X. nematophila* var. *pekingensis*

浓度 (Concentration)	菌株生长情况 (Strain growth status)
50 $\mu\text{g/ml}$	-
10 $\mu\text{g/ml}$	-
5 $\mu\text{g/ml}$	-
1 $\mu\text{g/ml}$	-

注: + 生长 - 不生长

2.1.3.3 链霉素抗性测定

链霉素和氯霉素一样,也是氨基糖糖苷类抗生素,抗菌机制是阻碍细菌蛋白质的合成。作用于细菌蛋白质合成过程,使之合成异常的蛋白,阻碍已合成蛋白的释放,使细菌细胞膜通透性增加而导致一些重要生理物质外漏,引起细菌死亡。从表 2-3 可以看出,嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株对 1 $\mu\text{g/ml}$ 的链霉素具有一定抗性,能够正常生长。

表 2-3 嗜线虫致病杆菌北京变种的链霉素抗性测定

Table 2-3 Analysis of streptomycin resistance of *X. nematophila* var. *pekingensis*

浓度 (Concentration)	菌株生长情况 (Strain growth status)
100 $\mu\text{g/ml}$	-
10 $\mu\text{g/ml}$	-
5 $\mu\text{g/ml}$	-
1 $\mu\text{g/ml}$	+

注：+ 生长 - 不生长

2.1.3.4 新霉素抗性测定

新霉素也属于氨基糖苷类抗生素的一种，通过干扰细菌蛋白质的合成，对各种革兰氏阴性杆菌有强大杀菌作用。从表 2-4 可以看出，嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株的生长受到新霉素的抑制。

表 2-4 嗜线虫致病杆菌北京变种的新霉素抗性测定

Table 2-4 Analysis of neomycin resistance of *X. nematophila* var. *pekingensis*

浓度 (Concentration)	菌株生长情况 (Strain growth status)
30 $\mu\text{g/ml}$	-
15 $\mu\text{g/ml}$	-
7.5 $\mu\text{g/ml}$	-
3.75 $\mu\text{g/ml}$	-

注：+ 生长 - 不生长

2.1.3.5 青霉素抗性测定

青霉素作为使用最广泛的抗生素，其作用机理主要是干扰细胞壁肽聚糖的合成。嗜线虫致病杆菌作为革兰氏阴性杆菌，肽聚糖是其细胞壁的主要成分。但是，从表 2-5 可以看出，嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株耐受青霉素的能力相当强，在高达 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度下，仍然能够正常生长。

表 2-5 嗜线虫致病杆菌北京变种的青霉素抗性测定

Table 2-5 Analysis of penicillin resistance of *X. nematophila* var. *pekingensis*

浓度 (Concentration)	菌株生长情况 (Strain growth status)
1,000 $\mu\text{g/ml}$	+
500 $\mu\text{g/ml}$	+
100 $\mu\text{g/ml}$	+
50 $\mu\text{g/ml}$	+

注：+ 生长 - 不生长

2.1.3.6 氨苄青霉素抗性测定

氨苄青霉素是另一种 β -内酰胺类抗生素,在基因工程操作中使用最为广泛。从表 2-6 可以看出,嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株对氨苄青霉素具有一定抗性,在低于 100 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度下能够正常生长。但是,如果将菌液继续培养,当培养时间为 6 d 时,在 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 的氨苄青霉素培养液中,I 型菌株也能生长使培养基变得浑浊(数据未显示)。这说明抗生素对菌株仅仅起到抑制作用,并非杀灭细菌。

表 2-6 嗜线虫致病杆菌北京变种的氨苄青霉素抗性测定

Table 2-6 Analysis of ampicillin resistance of *X. nematophila* var. *pekingensis*

浓度 (Concentration)	菌株生长情况 (Strain growth status)
1,000 $\mu\text{g/ml}$	-
500 $\mu\text{g/ml}$	-
100 $\mu\text{g/ml}$	+
50 $\mu\text{g/ml}$	+

注: + 生长 - 不生长

2.1.4 讨论

抗生素产生菌自身防卫机制研究的重要意义在于:1) 从抗生素产生菌中克隆抗生素抗性基因对于抗生素产生菌的 DNA 重组技术是非常重要的。因为这种抗性可作为克隆载体的标记,有人以抗生素的抗性作为标记来筛选获得新的抗生素产生菌。2) 有些抗生素的产生与质粒存在有关,但编码产生抗生素的基因并非同时定位在质粒上,因而可以设想,对某些因缺乏抗性基因而产量低的抗生素产生菌,可通过 DNA 重组技术,构建一株高水平产生抗生素的产生菌。3) 有助于对抗生素的生源进行研究。例如探索编码抗生素修饰酶的基因和编码核糖体修饰酶的基因,研究它们是否起源同一祖先,或是否同源蛋白。4) 利用自身防卫机制的特点,可以在临床发生以前及时发现新的抗性机制。这样在某些情况下可以通过对抗生素的结构战略修饰而防止临床抗药菌株的发生。5) 对核糖体钝化酶作用机制的研究,能够丰富对核糖体结构的认识(黄健强,1998)。

关于昆虫病原线虫共生细菌的抗生素抗性研究,虽然前人已有报道,但即使同种细菌内不同菌株之间对抗生素的抗性强弱也有所差异。Moeen 等(1998)采集分离了 32 个发光光杆状菌(*P. luminescens*)菌株和 11 个波氏致病杆菌(*X. poinarii*)菌株,将它们对几种不同抗生素的最小抑制浓度进行了研究,结果表明不同菌株对氯霉素、红霉素、新霉素和四环素的抗性强弱有所差异。所以,针对线虫共生细菌的不同菌株,有必要对其抗生素抗性进行具体的抗性测定,以便于在进一步的基因工程研究中使用。本文首先对线虫致病杆菌北京变种的抗生素抗性进行了测定。结果显示,该菌株对氯霉素、新霉素和卡那霉素敏感,对氨基糖苷类抗生素链霉素、 β -内酰胺类抗生素氨苄青霉素和青霉素具有不同程度的抗性。该菌株对不同抗生素的抗性特征,可以为该菌株的分子生物学研究提供依据。一方面,通过将菌株的氯霉素、新霉素和卡那霉素的敏感性作为基因操作中外源质粒载体的选择标记;另一方面,可以根据菌株的链霉素和 β -内酰胺类抗生素抗性来克隆抗生素相关基因,进一步进行抗生素的分子生物学研究。

2.2 不同转化方法对北京变种 I 型菌株生理生化特性的影响

转化是将外源基因导入宿主细胞最常用的方法，常见的细菌转化方法主要有：电击转化、化学转化和接合转移。电击转化的原理是由于锐利的电脉冲可在细胞膜造成小凹陷，并由此形成小至 2 纳米大至数纳米的疏水性孔洞。随着跨膜电压的增加，产生和维系疏水性孔洞所需的能量随之降低，一些较大的疏水性孔洞会转变为亲水性孔洞。在孔洞开放的时候，介质中的 DNA 很容易通过孔洞进入胞质（Weaver, 1993）。CaCl₂ 介导的化学转化方法的原理是：处于对数生长期的细菌放入 0 的 CaCl₂ 低渗溶液中，引起细胞膨胀，形成原生质球。当 DNA 加入后，变成了抗 DNase 的羟基-磷酸钙复合物，粘附在原生质球表面，在短暂的 42℃ 热激期间，原生质球就能吸收这种复合物。接合转移原理是通过质粒转移使遗传物质在两个细菌细胞间传递的机制。一个含有接合质粒的细胞（F⁺，致育性）与不含有接合质粒的细胞（F⁻）借助于细胞表面的 F⁺ 性菌毛形成交配个体。性菌毛收缩，使两个细胞接触，含有质粒的细胞（供体）的 DNA 转移到受体。在 F 质粒上携带的 tra 基因，含有接合过程所有的信息。DNA 以单链形式转移，滚环方式复制。转移的起始点在质粒 DNA 一条链一个称作 oriT 原点的缺口位点上。完整 DNA 链作为 DNA 合成的模板，而带缺口的 DNA 链则被置换和转移进入受体细胞。受体细胞合成互补的 DNA 链，F 质粒转移顺序其最后转移的基因为 tra 基因。在受体菌中 F 质粒环化得到一个 F⁺ 细胞，最后得到分离的交配体。

以上三种转化方法的主要操作流程是首先制备各自的感受态细胞，然后电击转化通过瞬时高压，CaCl₂ 介导的化学转化通过热激作用，接合转移通过亲本配对，使质粒载体进入感受态细胞内。由于致病杆菌基因操作研究起步较晚，目前成功地将外源基因转化进入嗜线虫致病杆菌的报道不多，有人认为主要原因是由于细菌本身的脆性所致，但是迄今为止尚无直接的研究报道对其进行阐述。

本研究以嗜线虫虫致病杆菌北京变种 I 型菌株为材料，使用不同的转化方法，对该菌株进行空白转化操作（即常规的不加 DNA 只加感受态细胞的阴性对照操作），系统分析菌株细胞的生理生化特性以及抑菌活性的变化，从而评价不同的转化操作方法对嗜线虫虫致病杆菌北京变种 I 型菌株的可行性。

2.2.1 实验材料

2.2.1.1 材料

嗜线虫致病杆菌北京变种(*X. nematophila* var. *pekingensis*) I 型菌株野生型：由本实验室分离、保存；

抑菌活性测定用指示菌枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)：由本实验室保存；

2.2.1.2 培养基

PDA 培养基：

新鲜土豆	200 g
蔗糖	20 g
H ₂ O	1000ml

抗生素鉴定培养基：购自北京三药科技开发公司

2.2.1.3 试剂

卡那霉素、氨苄青霉素购自 Sigma 公司；API 20E 试条购自 BioMerieux 公司。

2.2.2 实验方法

2.2.2.1 化学转化用感受态细胞的制备

所有步骤均在冰浴条件下操作：

- 1) 从活化的嗜线虫致病杆菌北京变种野生型 I 型菌株的 NBTA 平板上挑取单菌落接种到含 150 ml LB 液体培养基的 500 ml 三角瓶中，28℃，180 rpm 振荡培养，OD₆₀₀ 值达到 0.4 - 0.6。
- 2) 冰上冷却培养物至 0℃。
- 3) 6,000 rpm 离心 10 min，收集菌体。
- 4) 用等体积预冷的 0.1mol/L CaCl₂ 重悬菌体，离心，去上清。
- 5) 重复步骤 (4)。
- 6) 加入 2-3 ml 预冷的 0.1mol/L CaCl₂，悬浮菌体，分装成 100μl/1.5ml 离心管。
- 7) 液氮速冻，置 -70℃ 保存备用。

2.2.2.2 化学转化用感受态细胞的空白转化

- 1) 取 100 μl 上述 2.2.2.1 制备的感受态细胞，轻轻旋转以混匀内容物，冰上放置 30 分钟。
- 2) 将 Eppendorf 离心管置于 42℃ 水浴中热激
- 3) 90 秒，不要晃动 Eppendorf 离心管。
- 4) 迅速置于冰上，冷却细胞 2 分钟。
- 5) 加 900μl LB 液体培养基，28℃ 180 rpm 温育 1 h。
- 6) 取 100μl 培养液涂布于同时含有氨苄青霉素（终浓度 50 μg/ml）和卡那霉素（终浓度 25 μg/ml）的 LB 琼脂平板上，28℃ 培养 2~3 天检查转化菌落生长情况。

2.2.2.3 电击转化用感受态细胞的制备

所有步骤均在冰浴条件下操作：

- 1) 挑取 NBTA 固体培养基上的新鲜野生型 I 型菌株单菌落，接种于 150ml LB 液体培养基中，28℃ 180rpm 振荡培养过夜，菌液 OD₆₀₀ 值达到 0.5-0.6，冰上冷却培养物至 0℃。
- 2) 将菌液转入灭菌离心管，4℃ 6,000g 收集菌体，去上清，在吸水纸上倒置控干。
- 3) 加入等体积的预冷 10% 甘油，置于冰上，不时轻轻颠倒离心管，使菌体悬浮。
- 4) 4℃ 6,000g 收集菌体，去上清，在吸水纸上倒置控干。

- 5) 加入 1/2 体积的预冷 10% 甘油, 轻摇离心管, 将菌体悬浮。
- 6) 重复步骤 (4)
- 7) 加入 10ml 的预冷 10% 甘油, 轻摇离心管, 将菌体悬浮。
- 8) 重复步骤 (4)
- 9) 加入 2ml 的预冷 10% 甘油, 悬浮菌体, 分装成 40 μ l/1.5ml 离心管。
- 10) 液氮速冻, 置 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.2.2.4 电击转化用感受态细胞的空白转化

- 1) 取 50 μ l 上述 2.2.2.3 制备的感受态细胞, 轻轻旋转以混匀内容物, 冰上放置 10 分钟。
- 2) 设置电击程序 (pre-set protocol-E.coli)。
- 3) 将混合液转入预冷的 0.2cm 电击杯中, 盖上盖, 放入电击池中。
- 4) 电击 (Pulse)。
- 5) 取出电击杯, 立即加入 1ml LB 培养基, 轻轻混匀。
- 6) 将菌液转移到预冷的 1.5ml 离心管中, 180rpm, 28 $^{\circ}$ C 培养 1h。
- 7) 记录电击参数, 时间常数必须接近 5 milliseconds。
- 8) 取 100 μ l 培养液涂布于同时含有氨苄青霉素 (终浓度 50 μ g/ml) 和卡那霉素 (终浓度 25 μ g/ml) 的 LB 琼脂平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养 2~3 天检查转化菌落生长情况。

2.2.2.5 接合转移用感受态细胞的制备

- 1) 挑取 NBTA 固体培养基上的新鲜野生型 I 型菌株单菌落, 接种于 100ml LB 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C 180rpm 振荡培养过夜, 菌液 OD₆₀₀ 值达到 0.4-0.6。
- 2) 1500r/min 离心 15min, 弃上清。
- 3) 等体积 LB 悬浮沉淀, 再次 1500r/min 离心 15min, 弃上清。
- 4) 用 1/10 体积的 LB 培养基悬浮菌体。分装成 100 μ l/1.5ml 离心管。
- 5) 液氮速冻, 置 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.2.2.6 接合转移用感受态细胞的空白转化

- 1) 取 100 μ l 上述 2.2.2.5 制备的感受态细胞, 轻轻旋转以混匀内容物。
- 2) 将孔径为 0.45 μ m 的灭菌微孔滤膜置于不含抗生素的 LB 琼脂平板上。
- 3) 将感受态细胞滴于孔径为 0.45 μ m 的灭菌微孔滤膜上。
- 4) 28 $^{\circ}$ C 培养 8 hr。
- 5) 将滤膜上的菌液洗脱在 LB 培养基中, 稀释至合适的浓度。
- 6) 取 100 μ l 菌液涂布在含有氨苄青霉素(50 μ g/ml)、卡那霉素(25 μ g/ml)的 LB 琼脂平板。28 $^{\circ}$ C 培养 2~3 天检查转化菌落生长情况。取 100 μ l 菌液涂布在含有氨苄青霉素(50 μ g/ml)的 LB 琼脂平板, 用以作为对照。

2.2.2.7 菌落对色素的吸收

挑取固体培养基上的新鲜单菌落, 涂布在 NBTA 平板上。28 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 2-3d, 观察菌落形态及其颜色。

2.2.2.8 菌落在API试条的反应

- 1) 在一无菌试管中盛 5ml 的无菌水；
- 2) 以接种针从分离物的平板上挑取纯化的单菌落至试管中；
- 3) 仔细研匀以达到均一的细胞悬液；
- 4) 用吸管将细菌悬液充满柠檬酸 CIT、乙酰甲基甲醇 VP 和明胶 GEL 管；
- 5) 其他管仅充满管部；
- 6) 在精氨酸双水解酶 ADH、赖氨酸脱羧酶 LDH、脲酶 URE、鸟氨酸脱羧酶 ODE 和硫化氢 H_2S 管需要厌氧培养，则用液体石蜡覆盖；
- 7) 盖上盖子，28℃ 培养箱中培养 18-24 小时；
- 8) 观察结果，并做以下补充实验；
- 9) VP 测定：各加 1 滴 VP1 和 VP2 试剂，至少等待 10 分钟，浅粉或红色表明阳性结果；
- 10) TDA 测定：加 1 滴 TDA 试剂，深褐色为阳性反应；
- 11) IND 测定：加 1 滴 James 试剂，反应立即发生，粉红色出现在整个反应管者为阳性；
- 12) NO_2 测定：各加 1 滴 Nit1 和 Nit2 试剂于葡萄糖管内，代 2~3 分钟后，红色表示阳性。

2.2.2.9 菌落过氧化氢酶活性测定

在灭菌的培养皿中滴加 50 μ l 3% 的 H_2O_2 ，用接种针挑取固体培养基上的新鲜单菌落，涂抹在液体中央，观察结果。有气泡产生的为阳性，无气泡产生的为阴性。

2.2.2.10 菌落生长曲线的制定

挑取固体培养基上的新鲜单菌落，接种于 20ml LB 培养基的 100ml 三角瓶中，28℃，180rpm 培养 24 小时，得到种子培养液。调节菌液浓度使各处理 OD 值相等，按照 1% 的比例将上述种子培养液接种到装有 50ml LB 培养液的 250ml 三角瓶中，28℃，180rpm 摇床培养 48 小时，前 24 小时每 2 小时取一次样，后 24 小时每 4 小时取一次样，测定每个样品菌体密度 (OD_{600})。

2.2.2.11 菌落抑菌活性的测定

枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 菌种在 PDA 固体斜面培养 3 天，用 0.85% 生理盐水洗下，配成 OD_{620nm} 值为 0.33 的菌悬液，保存于 4℃ 冰箱备用。采用管碟法，在自制的平板上 (29×21×2.5cm)，倒入 150ml 含 1% 枯草芽孢杆菌菌悬液的抗生素检定培养基，待其凝固后，放上牛津杯，加入 0.28 ml 细菌发酵液，每个处理重复 4 次，28℃ 培养 16h，测定抑菌圈直径。试验重复 3 次。

2.2.3 结果与分析

2.2.3.1 不同转化方法对北京变种卡那霉素抗性的影响

嗜线虫致病杆菌北京变种野生型菌株经过不同的转化操作以后，其抗生素抗性特性发生了不同的变化。本实验仅以卡那霉素抗性为例进行了研究。从表 2-7 可以看出，经受了电击转化方法和 $CaCl_2$ 介导的化学转化方法操作后，该菌株由卡那霉素敏感型转变成卡那霉素耐受型。但经受接合转移方法操作后，该菌株的卡那霉素敏感型特性没有改变。也就是说，接合转移方法对嗜线虫致病杆菌北京变种野生型菌株抗生素抗性的影响不大。

表 2-7 不同转化方法对嗜线虫致病杆菌北京变种卡那霉素抗性的影响

Table 2-7 Effects of Transformation on kanamycin resistance of *X. nematophila* var. *pekingensis*

转化方法	卡那霉素平板生长情况
Transformation methods	Growth on kanamycin-contained plate
电击转化	+
化学转化	+
接合转移	-
野生型菌株	-

注：+ 生长 - 不生长

2.2.3.2 不同转化方法对北京变种色素吸收的影响

嗜线虫致病杆菌北京变种野生型 I 型菌株的最典型特征之一是在 NBTA 培养平板上培养 36-48 小时呈蓝色。经过不同转化操作的菌株对色素的吸收能力发生了不同的变化。经电击转化和 CaCl₂ 介导的化学转化操作的菌株颜色呈深红色，而经接合转移方法的菌株颜色与野生型菌株的完全一样，呈现蓝色特性（图 2-1）。另外，电击转化后菌落在固体培养基上显得比较干燥，化学转化后获得的菌落则十分光滑湿润，而经接合转移操作的菌落和野生型菌落的润滑性一致，均介于电击转化和化学转化之间。

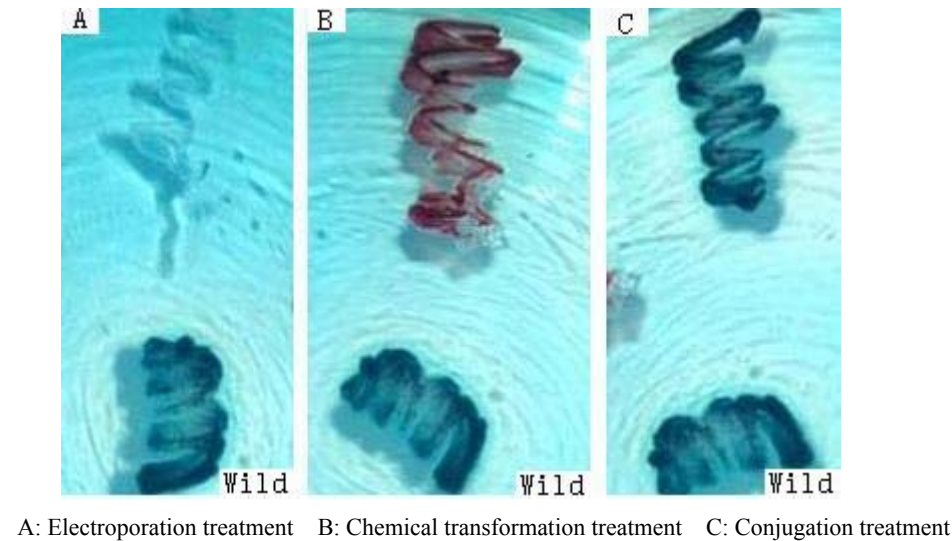


图2-1不同转化方法对嗜线虫致病杆菌北京变种色素吸收的影响

Fig 2-1 Effects of Transformation on dye absorption activity of *X. nematophila* var. *pekingensis*

2.2.3.3 不同转化方法对北京变种细胞内代谢作用的影响

实验结果（图 2-2）表明：运用不同的转化操作方法，对嗜线虫致病杆菌北京变种菌株细胞内代谢活动产生的影响也各不相同。从图中可以看出，经过接合转移的菌株与野生型菌株的反应几乎完全一致，说明接合转移操作对细菌基本上不产生影响。在测试的 20 个反应管中，电击转化处理的菌株有 2 个反应和野生型明显不同，它们是 VP、蔗糖(SAC)利用；而葡萄糖(GLU)和山梨醇(SOR)利用也发生了肉眼可见的差异。比较而言，化学转化方法对菌株的影响最大，除了 β-半乳糖苷(ONPG)而外，吲哚(IND)、明胶(GEL)活性均发生了变异；而在糖类利用上变化尤为突

出，在测试的 9 种糖类中除了肌醇(INO)、鼠李糖(RHA)、苦杏仁甙(AMY)而外，对其他 6 种糖类都呈阳性反应。具体反应见表 2-8。



图2-2不同转化方法对嗜线虫致病杆菌北京变种细胞代谢反应的影响

Fig 2-2 Effects of Transformation on metabolism activities of *X. nematophila* var. *pekingensis*

表 2-8 不同转化方法对嗜线虫致病杆菌北京变种细胞代谢反应的影响

Table 2-8 Effects of Transformation methods on metabolism of *X. nematophila* var. *pekingensis*

	电击转化处理 Electroporation	化学转化处理 Chemical	接合转移处理 Conjugation	野生型（对照） Wild (Control)
- 半乳糖苷(ONPG)	-	+	-	-
精氨酸双水解酶(ADH)	-	-	-	-
赖氨酸脱羧酶(LDC)	-	-	-	-
鸟氨酸脱羧酶(ODC)	-	-	-	-
枸橼酸盐(CIT)	-	-	-	-
硫化氢(H ₂ S)	-	-	-	-
尿素(URE)	-	-	-	-
色氨酸脱羧酶(TDA)	-	-	-	-
吲哚(IND)	-	+	-	-
V . P	-	+	+	+
明胶(GEL)	-	+	-	-
葡萄糖(GLU)	+ /-	+	-	-
甘露醇(MAN)	-	+	-	-
肌醇(INO)	-	-	-	-
山梨醇(SOR)	+ /-	+	-	-
鼠李糖(RHA)	-	-	-	-
蔗糖(SAC)	+	+	-	-
密二糖(MEL)	-	+	-	-
苦杏仁甙(AMY)	-	-	-	-
阿拉伯糖(ARA)	-	+	-	-

注： + 阳性反应 - 阴性反应 +/- 弱阳性反应

2.2.3.4 不同转化方法对北京变种过氧化氢酶活性的影响

嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株过氧化氢酶阴性，而经过 CaCl_2 介导的化学转化方法操作后的菌落，呈现过氧化氢酶阳性反应，其他两种方法，即经电击转化和接合转移的菌落的过氧化氢酶活性没有发生改变，依然为阴性（表 2-9）。

表 2-9 不同转化方法对嗜线虫致病杆菌北京变种过氧化氢酶活性的影响

Table 2-9 Effects of Transformation methods on Catalase activity of *X. nematophila* var. *pekingensis*

转化方法 Transformation methods	过氧化氢酶活性 Catalase activity
电击转化	-
化学转化	+
接合转移	-
野生型菌株	-

注：+ 阳性反应 - 阴性反应

2.2.3.4 不同转化方法对北京变种生长曲线的影响

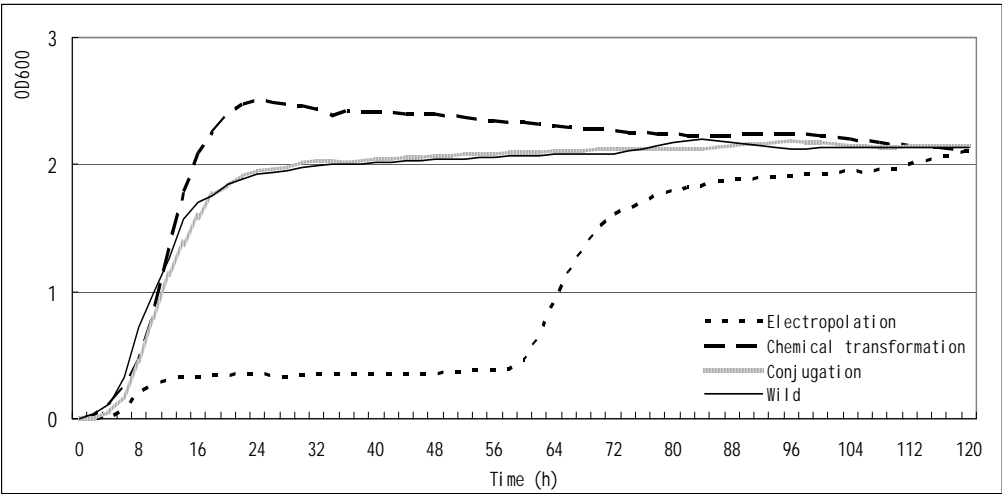


图2-3 不同转化方法对嗜线虫致病杆菌北京变种生长曲线的影响

Fig 2-3 Effects of Transformation on growth curve of *X. nematophila* var. *pekingensis*

从图 2-3 可以看出，接合转移操作对细胞的影响不大，细菌生长曲线和野生型菌株一致，均在 24 h 达到稳定期。经过化学转化操作得到的菌株，尽管在接种后 12 h 内生长比野生型有所延滞，但是以后生长速度明显快得多，细菌在接种后 24 小时吸收值 OD_{600} 达到 2.509，比野生型的 OD_{600} (1.928) 高 30.1%。随后，化学转化处理的菌株细菌出现了死亡速度大于繁殖速度的情况，吸收值逐渐降低并在 84 h 左右与野生型菌株趋于一致。而经过电击转化处理后筛选出来的菌落，其生长与野生型菌株差异极大，生长曲线出现了双 S 型。尽管在接种后 12h 就提早进入稳定期，但是菌液浓度很低， OD_{600} 在 0.3-0.45 之间持续 48 小时。从接种后 60h 开始，该菌株进入了第二个对数生长期，直到接种后 84 小时，基本到达稳定期，菌液浓度也逐渐与野生型菌株持平。

2.2.3.6 不同转化方法对北京变种抑菌活性的影响

经过接合转移操作的菌株,其抑菌活性同样维持着较高的水平,与野生型没有显著差异,抑菌圈直径分别为 27.40 mm 和 27.86 mm。而经过电击转化和化学转化操作后的菌株,其抑菌活性大大降低,抑菌圈直径仅分别为 18.91 mm 和 16.95 mm (图 2-4)。这说明这两种转化操作方法对细菌产生抗生素的能力起负调控的作用。

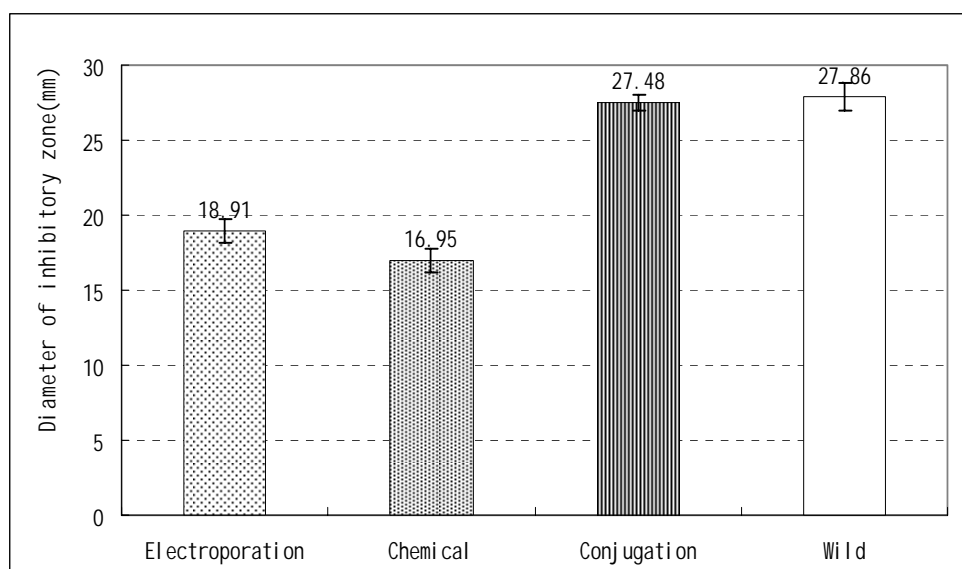


图2-4 不同转化方法对嗜线虫致病杆菌北京变种抑菌活性的影响

Fig 2-4 Effects of Transformation on inhibitory activity of *X. nematophila* var. *pekingensis*

2.2.4 讨论

2.2.4.1 转化操作对北京变种卡那霉素抗性的影响

近年来,有学者从遗传学途径出发,提出激活沉默基因产生新抗生素的方法,即通过基因克隆、诱变处理、菌株或种间自然接合、原生质体融合等方法可以激活沉默基因,产生新的抗生素(Hopwood, 1980)。随着筛选步骤的创新,这一理论已在某些实验室得到成功的验证(Horinichi, 1983; Jones, 1984a; Jones, 1984b; Yamashita, 1985; Hutchinson, 1989)。国内吕淑君和陈能(1996)根据沉默抗性基因的原理设计了一种新抗生素筛选方法,他们用抗生素抗性基因探针的菌落杂交方法,从大量野生型链霉菌中筛选可能含有抗生素抗性沉默基因的若干天然无抗菌活性的链霉菌作为诱变对象,再通过紫外线诱变、原生质体再生、融合等手段,使其产生了抗菌活性。

本实验在操作过程中发现,运用化学转化和电击转化方法,均可以得到嗜线虫致病杆菌北京变种的卡那霉素抗性菌株,这表明细菌 DNA 中可能存在卡那霉素抗性基因,在野生型菌株中该基因处于沉默状态。一旦受到外界刺激,如本研究中的热激处理和瞬时高压处理,细胞即作出应答反应,打开调控基因开关,使相关的基因开始转录,表达成相应的酶类或者其他蛋白,从而表现出卡那霉素抗性。这说明化学转化和电击转化对嗜线虫致病杆菌北京变种的生物学特性产生了影响,但给我们以启示,化学转化和电击转化似乎也可以为菌株筛选提供新的方法。

2.2.4.2 不同转化方法对北京变种生理生化特性的影响

致病杆菌只能在线虫肠腔和昆虫寄主血淋巴之间移动,以抵御外界环境变化,在天然条件下尚未鉴定出能自主生活的致病杆菌。因此,这些细菌在实验室条件下脆性很大,使人们对致病杆菌进行遗传操作时受到限制(Xu & Hurlbert, 1990; Dunphy, 1998)。本研究运用不同的转化操作技术,对嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌进行处理,系统分析比较各种方法对细菌生理生化特性产生的影响,为细菌的进一步转化操作奠定基础。这方面研究目前在国内外尚未见报道。

本研究结果表明,经过电击转化处理以后,出现了卡那霉素抗性细菌;在 NBTA 培养基上的菌落由野生型的蓝色变为暗红;API 试条中,V-P 反应、蔗糖(SAC)、葡萄糖(GLU)和山梨醇(SOR)利用发生了差异;生长曲线呈双 S 型;抑菌活性降低。也就是说,经过电击转化操作以后,嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株的生理生化活性发生了很大的变化,细菌增殖模式和糖类代谢途径发生了一定的变化。电击转化法对菌株生理生化特性的严重影响可能是该方法迄今为止一直难以在致病杆菌得到应用的原因之一。

利用 CaCl_2 介导的化学转化将质粒转化进入嗜线虫致病杆菌细胞的报道目前只有一例。Xu 等(1989)证明 *X. nematophila* ATCC 19061 细胞经二甲亚砜处理后可得到约 $10^5 \sim 10^6$ 转化子/ μg pHK17 的转化率。但如果 pHK17 是从大肠杆菌中提取而来,则转化率将至少降低 250 倍。报道中他们还指出,虽然模式菌株 ATCC 19061 能有效地转化,但用同样方法处理另一菌株(*X. nematophila* IM/1),转化却不成功。本研究也曾进行过该方法的尝试,结果也难以转化成功。进一步按照 CaCl_2 介导的化学转化操作方法,对嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株进行处理,结果发现菌株卡那霉素抗性、色素吸收、抑菌活性变化与电击转化操作的结果相类似;在 API 试条上显示的生理生化反应所受影响更为严重。受体菌经处理后发生的这些负面生理生化变化表明,化学转化方法不是一种合适的处理嗜线虫致病杆菌北京变种的好方法,这可能也是该方法十几年来在致病杆菌中一直没有后续报道的原因之一。

国外已有报道利用接合转移方法将质粒转入嗜线虫致病杆菌, Eric 等 (2003) 在研究细菌和线虫的共生作用时,利用 *E. coli* S17-1 λ pir 菌株将质粒接合转入 *X. nematophila* 经过氯霉素筛选,构建的工程菌株能够组成型表达发绿荧光蛋白。本研究中发现经过接合转移操作的菌株各方面特性和野生型菌株一致,即接合转移方法对嗜线虫致病杆菌北京变种菌株本身的特性影响最小。此试验结果与前人观点吻合,确认接合转移是目前将质粒转入嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株最可靠的方法。以下将对接合转移在嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株中的应用作进一步的研究。

2.3 外源质粒导入对北京变种生理生化特性的影响

转移性质粒是指质粒能自动地从一个细胞转移到另一个细胞,甚至还能带动供体细胞的染色体 DNA 向受体细胞转移,这类质粒常常被叫做自主转移质粒 (self-transmissible plasmid)。质粒在细菌间的转移,需要供体和受体细胞间的直接接触才能进行,就是所谓的接合作用,因此这类质粒又被叫做接合质粒 (conjugative plasmid)。但是有些接合质粒不能自主转移,需要被其他一些自主转移质粒诱动才能完成转移,故这些接合质粒又称为可诱动质粒 (mobilizable plasmid)。

大多数自主转移质粒都有 tra 基因和 oriT 位点,二者在自主转移质粒的接合转移过程中起着重要作用。大多数 tra 基因的产物与性菌毛的形成、杂交对的形成有关;有些 tra 基因编码作用于 oriT 位点的内切酶,使质粒中的一条 DNA 链产生切口,从而开始转移;有些 tra 基因则与质粒转移调控等有关。oriT 位点不仅是质粒转移的起始位点,也是质粒转移后 DNA 末端再环化的位点,因此质粒必须具有 oriT 位点才能进行自主转移。自主转移质粒能诱导含有与自己相同或相似的 oriT 位点的非自主转移质粒进行转移。如果将自主转移质粒整合到染色体上后,带动染色体转移也是从质粒的 oriT 位点开始的。

可诱动质粒虽然含有类似于 oriT 位点的 mob 位点,但由于缺乏 tra 基因,所以不具有自主转移能力,需要在自主转移质粒的帮助下进行。本研究选用 pLA2917 和 pSZ21 两种可诱动质粒,尝试在自主转移质粒 pRK2013 的诱动下,将此两种供体质粒分别转移到嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株受体细胞中。以 pLA2917 为例,其操作原理如下:帮助质粒 pRK2013 和供体质粒 pLA2917 分别含有 tra 基因和 oriT 位点,它们组成双质粒接合转移系统,通过三亲杂交方法完成。先将 pLA2917 和 pRK2013 分别导入大肠杆菌,然后将大肠杆菌(pLA2917) 大肠杆菌(pRK2013) 及受体菌三个不同的菌株混合培养,pRK2013 可以转移到大肠杆菌(pLA2917) 菌株中。接着 pLA2917 在 pRK2013 的诱动下,从大肠杆菌转移到受体菌,这样就完成了质粒的转移。本实验用接合转移的方法进行外源质粒的导入,同时对含有外源质粒的嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株转化接合子的生理生化特性和抑菌活性进行了研究。

2.3.1 实验材料

2.3.1.1 材料

嗜线虫致病杆菌北京变种(*X. nematophila* var. *pekingensis*) 野生型 I 型菌株由本实验室分离、保存;转化用大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α [*supE55* Δ *lacU169*(ψ 80*lacZ* Δ M15)*hsdR17 recA endA* *Nx^r*]由本实验室保存;供体质粒 pSZ21、pLA2917 和帮助质粒 pRK2013 系中国农业科学院生物技术研究所以林敏研究员提供;抑菌活性测定用指示菌枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)由本实验室保存;

2.3.1.2 试剂

质粒提取试剂盒购自北京赛百盛基因技术有限公司和天为时代生物工程公司;化学试剂(分析纯)购自北京化学试剂公司。

2.3.2 实验方法

2.3.2.1 大肠杆菌感受态细胞的制备

所有步骤均在冰浴条件下操作：

- 1) 挑取 LB 固体培养基上的新鲜大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 单菌落，接种于 20ml LB 液体培养基中，37℃ 200rpm 振荡培养，菌液 OD₆₀₀ 值达到 0.5-0.6，冰上冷却培养物至 0℃。
- 2) 将菌液转入灭菌离心管，4℃ 2700g 收集菌体，去上清，在吸水纸上倒置控干。
- 3) 加入 20ml 的预冷 10% 甘油，置于冰上，不时轻轻颠倒离心管，使菌体悬浮。
- 4) 4℃ 2700g 收集菌体，去上清，在吸水纸上倒置控干。
- 5) 加入 10ml 的预冷 10% 甘油，轻摇离心管，将菌体悬浮。
- 6) 重复步骤 (4)
- 7) 加入 10ml 的预冷 10% 甘油，轻摇离心管，将菌体悬浮。
- 8) 重复步骤 (4)
- 9) 加入 200 μ l 的预冷 10% 甘油，悬浮菌体，分装成 50 μ l/1.5ml 离心管。
- 10) 液氮速冻，置 -70℃ 保存备用。

2.3.2.2 供体质粒和帮助质粒在感受态细胞的电击转化

- 1) 取上述 3.2.1 制备的感受态细胞 (40 μ l) 于 1.5ml Eppendorf 管中，冰上融化。
- 2) 加入 1-2 μ l 含质粒，轻轻混匀，置于冰上约 1min。
- 3) 设置电击程序 (pre-set protocol-*E. coli*): 2 mm, 2500V。
- 4) 将混合液转入预冷的 0.2cm 电击杯中，盖上盖，放入电击池中。
- 5) 电击 (Pulse)。
- 6) 取出电击杯，立即加入 1ml LB 培养基，轻轻混匀。
- 7) 将菌液转移到预冷的 1.5ml 离心管中，200rpm, 37℃ 培养 45min。
- 8) 记录电击参数，时间常数必须接近 5 milliseconds。
- 9) 培养菌液涂布平板，质粒 pSZ21 和 pRK2013 平板含卡那霉素(25 μ g/ml)，质粒 pLA2917 平板含四环素(10 μ g/ml)、卡那霉素(25 μ g/ml)。37℃ 培养。
- 10) 用灭菌牙签分别挑取转化子于 LB 液体培养基中培养，树脂法提取质粒并进行电泳鉴定转化子。

2.3.2.3 质粒在北京变种中的接合转移

- 1) 嗜线虫致病杆菌北京变种野生型 I 型菌株的感受态细胞的制备同 3.2.5。
- 2) 挑取 2.3.2.2 获得的含有供体质粒和帮助质粒的大肠杆菌转化子单菌落，分别接种于 100ml LB 液体培养基中，37℃ 200rpm 振荡培养，菌液 OD₆₀₀ 值达到 0.4-0.6，其他操作同 3.2.5。
- 3) 取步骤 (2) 制备的分别含有供体质粒和帮助质粒的大肠杆菌制备液各 20 μ l 于 1.5ml Eppendorf 管中，然后加入 100 μ l 步骤 (1) 制备的嗜线虫致病杆菌北京变种的受体细胞，轻轻旋转以混匀内容物。

- 4) 将孔径为 0.45um 的灭菌微孔滤膜置于不含抗生素的 LB 琼脂平板上。
- 5) 将细菌混合液滴于孔径为 0.45um 的灭菌微孔滤膜上。
- 6) 28℃ 培养 8 hr。
- 7) 将滤膜上的菌液洗脱在 LB 培养基中，稀释至合适的浓度。
- 8) 取 100 - 150ul 菌液涂布平板，供体质粒 pSZ21 接合转移的平板含氨苄青霉素(50μg/ml)和卡那霉素(25μg/ml)，供体质粒 pLA2917 接合转移的平板含四环素(10μg/ml)、氨苄青霉素(50μg/ml)和卡那霉素(25μg/ml)。28℃ 培养 2-3 天。
- 9) 用 PCR 扩增和质粒提取进行转化子的鉴定。

2.3.2.4 转移接合子的PCR鉴定

对于转移接合子的检测采用 PCR 的方法进行。

根据嗜线虫致病杆菌北京变种的 DNA 序列片段 (GenBank AY317152) 设计引物 14-2 如下：

Upper primer : 5' TAT GTA TTC TAC CGG ACG GG 3'

Lower primer : 5' TAT CAC AAC CTA CCC GTT CC 3'

参照闫春玲等(2003a)的方法,根据卡那霉素抗性基因序列核心序列设计引物 nptII 如下:

Upper primer: 5' GGT GCC CTG AAT GAA CTG 3'

Lower primer: 5' TAG CCA ACG CTA TGT CCT 3'。

引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

反应体系：

模板 DNA (菌液)	2	μl
上游引物 (2.5 uM)	1	μl
下游引物 (2.5 uM)	1	μl
dNTPs (10 uM)	0.4	μl
10×Buffer	2	μl
Taq DNA 聚合酶 (2U/μl)	0.5	μl
ddH ₂ O	13.1	μl
总体积	20	μl

PCR 反应程序 (14-2)：

94	预变性 DNA	5 min
94	变性	1 min
55	退火	1 min
72	延伸	1 min
34 个循环后		
72	充分延伸	10 min

PCR 反应程序 (nptII)：

94	预变性 DNA	5 min
94	变性	1 s
50	退火	1 s

72 延伸 60 s

35 个循环后

72 充分延伸 5 min

反应结束后进行琼脂糖凝胶电泳，检测。

2.3.2.5 转移接合子中质粒的提取

使用 UltraPure™ 质粒 DNA 小量提取试剂盒。

- 1) 将 3-5ml 菌液 13,000 rpm 离心 30 秒收集沉淀（菌体）。
- 2) 倒掉上清，将沉淀完全悬浮于 100 ul 悬浮液（溶液 I）中。
- 3) 加入 150ul 裂解液（溶液 II），轻柔地颠倒混匀 10 次左右，溶液逐渐变得粘稠、清亮。
- 4) 加入 150ul 中和液（溶液 III），轻柔地颠倒混匀 10 次左右。
- 5) 13,000rpm 离心 8-10 分钟，将上清液小心转入一个新的 1.5ml 离心管中，加入 0.4ml 纯化树脂（使用前充分混匀），颠倒混匀 3 分钟。
- 6) 将纯化树脂及上清液的混和物吸入离心纯化柱中，13,000rpm 离心 30 秒，倒掉收集管中的废液。
- 7) 将纯化柱重新套入废液收集管中，加入 600ul 80%乙醇，13,000rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液。
- 8) 重复第（7）步 1-2 次，尽可能将杂质去除。
- 9) 取出纯化柱，将其套入一个干净的 1.5ml 离心管，加入 50ul TE 缓冲液或超纯水于纯化树脂上，室温下放置 5 分钟后，13,000rpm 离心 1 分钟。
- 10) 离心管中收集的液体即是洗脱下来的质粒 DNA，1%琼脂糖凝胶电泳检测其纯度并目测定量。 -20℃ 保存备用。

2.3.2.6 转移接合子对色素的吸收

同 2.2.2.7。

2.3.2.7 转移接合子过氧化氢酶活性的测定

同 2.2.2.9。

2.3.2.8 转移接合子在 API 试条的反应

同 2.2.2.8。

2.3.2.9 转移接合子生长曲线的制定

同 2.2.2.10。

2.3.2.10 转移接合子抑菌活性的测定

同 2.2.2.11。

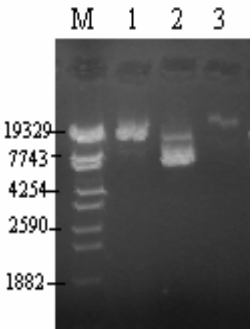
2.3.2.11 转移接合子氯霉素抗性测定

根据张杰等（1995），操作方法参照 2.1.2.1 和 2.2.2.2。

2.3.3 结果与分析

2.3.3.1 供体质粒和帮助质粒在大肠杆菌的转化

本实验首先利用电击转化方法，将供体质粒 pSZ21 和 pLA2917、帮助质粒 pRK2013 分别转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。提取质粒，琼脂糖凝胶电泳如图 2-5，结果表明转化成功。



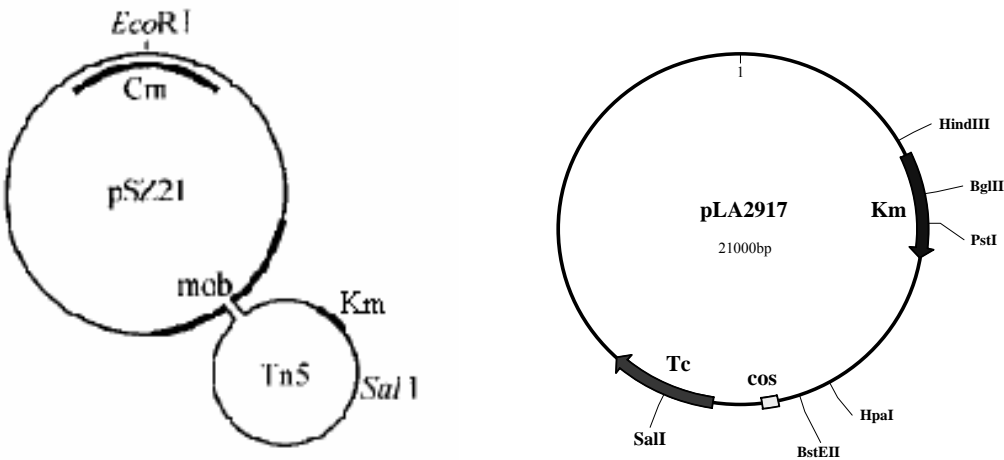
M: Marker; 1: pSZ21 ; 2: pRK2013; 3: pLA2917

图2-5 分别转化到大肠杆菌中的供体质粒和帮助质粒

Fig 2-5 Donor and helper plasmids transformed into *E. coli* reespectively

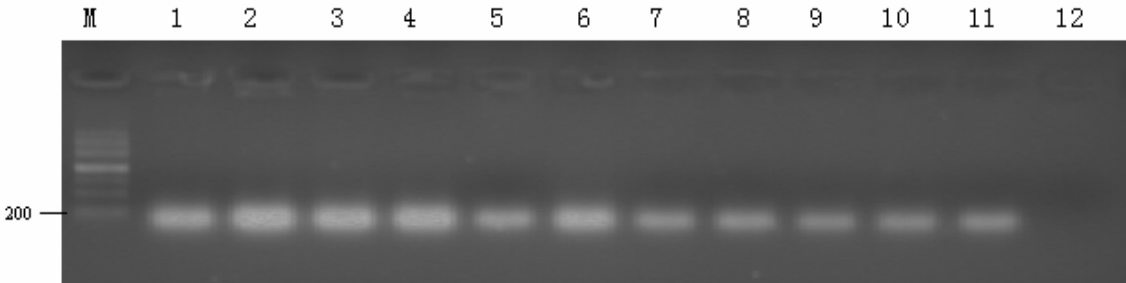
2.3.3.2 质粒在嗜线虫致病杆菌北京变种的接合转移

本实验应用滤膜上三亲交配的接合转移方法，以嗜线虫致病杆菌北京变种作为受体细菌进行质粒转化操作。由于质粒 pSZ21 具有卡那霉素抗性，而且已经知道嗜线虫致病杆菌北京变种受体菌本身具有氨苄青霉素抗性，所以在卡那霉素和氨苄青霉素双重选择压力下，筛选得到的菌落被认为是含有质粒 pSZ21 的嗜线虫致病杆菌北京变种接合子。同样，由于质粒 pLA2917 具有卡那霉素和四环素抗性，在卡那霉素、四环素和氨苄青霉素的选择压力下，可以筛选得到含有质粒 pLA2917 的嗜线虫致病杆菌北京变种接合子。结果表明，两种质粒的接合转移效率均较高，约为 1.0×10^{-6} (接合子菌落数/受体菌落数)。



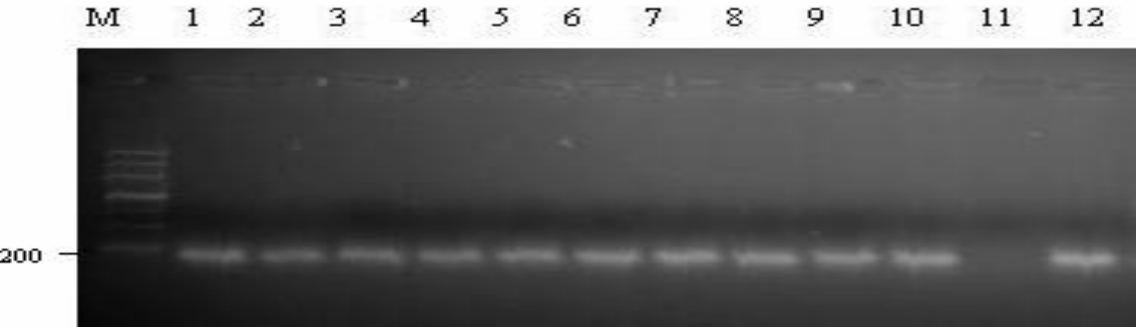
2.3.3.3 转移接合子的PCR鉴定

根据嗜线虫致病杆菌北京变种已知的 DNA 序列设计引物 14-2，菌液 PCR 扩增，野生型受体菌和接合子在 200bp 左右均有一条明显的扩增条带，而供体菌菌液未扩出目标条带（图 2-6, 图 2-7），表明得到的接合子确实源于受体菌株嗜线虫致病杆菌北京变种。



M: Marker; 1-10: pSZ21 transconjugants; 11: Wild type strain; 12: pSZ21- contained E.coli

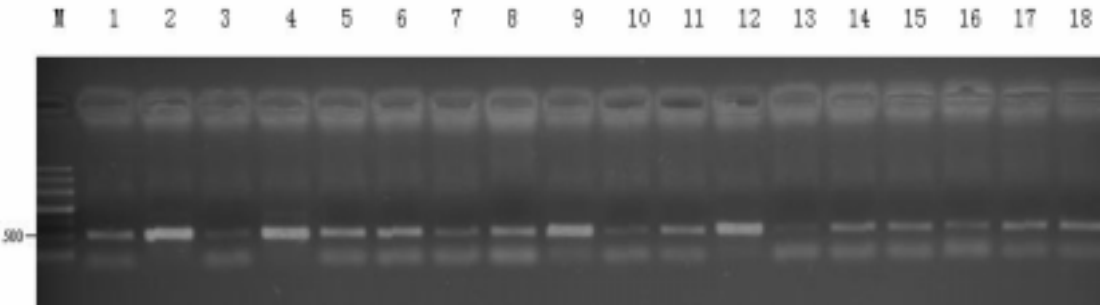
图2-6 用引物14-2对嗜线虫致病杆菌北京变种pSZ21接合子的PCR扩增
Fig 2-6 PCR amplification of pSZ21 transconjugants with primer 14-2



M: Marker; 1-10: pLA2917 transconjugants; 11: pLA2917- contained E.coli 12: Wild type strain

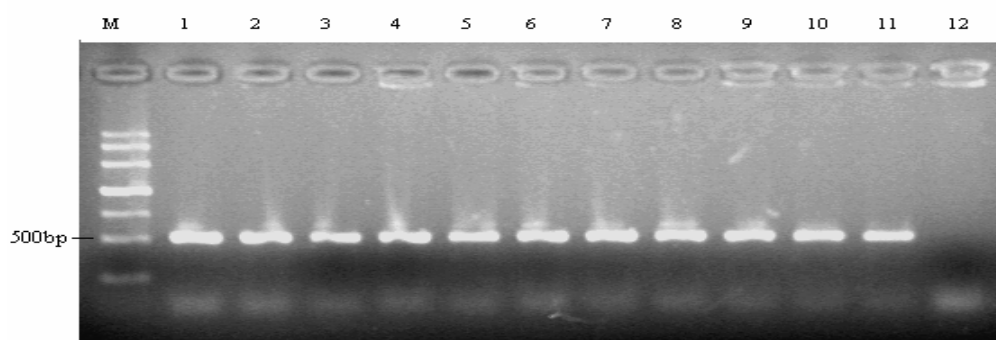
图2-7 用引物14-2对嗜线虫致病杆菌北京变种pLA2917接合子的PCR扩增
Fig 2-7 PCR amplification of pLA2917 transconjugants with primer 14-2

根据卡那霉素抗性基因设计引物，随机挑取接合子菌落,直接进行菌体 PCR 扩增，在 500bp 左右均有一条明显的扩增条带（图 2-8, 图 2-9），阳性率为 100%。



M: Marker; 1-18: pSZ21 transconjugants

图2-8 用引物nptII对嗜线虫致病杆菌北京变种pSZ21接合子的PCR扩增
Fig 2-8 PCR amplification of pSZ21 transconjugants with primer nptII



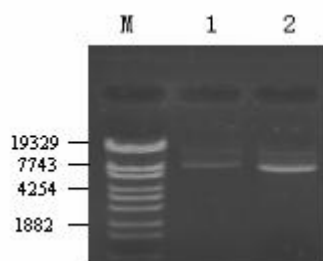
M: Marker; 1-10: pLA2917 transconjugants; 11: pLA2917- contained E.coli 12: Wild type strain

图2-9 用引物nptII对嗜线虫致病杆菌北京变种pLA2917接合子的PCR扩增

Fig 2-9 PCR amplification of pLA2917 transconjugants with primer nptII

2.3.3.4 转移接合子质粒的稳定性

提取质粒，得到的质粒大小与对照大小一致。在不含有任何抗生素的培养基中，也就是在无选择压力的情况下，将接合子继代培养 10 代，结果发现，无论是嗜线虫致病杆菌北京变种 pSZ21 接合子，还是 pLA2917 接合子，各自转入的质粒能够稳定存在（图 2-10, 图 2-11）。证实外源质粒已经成功转移到受体细菌细胞内。



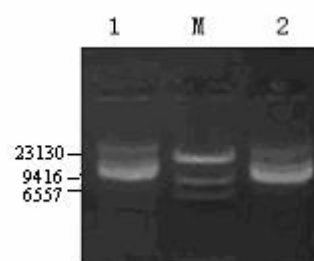
M: Marker; 1: 对照质粒 pSZ21

2: 接合子培养 10 代后的质粒

图2-10 嗜线虫致病杆菌北京变种pSZ21接合子的质粒稳定性

Fig 2-10 Plasmid stability of pSZ21 Transconjugant of

X. nematophila var. *Pekingensis*



M: Marker; 1: 对照质粒 pLA2917

2: 接合子培养 10 代后的质粒

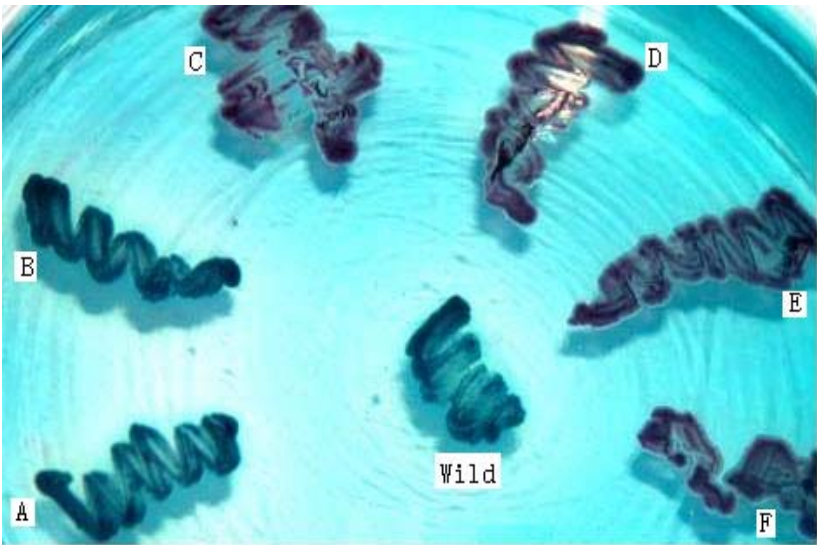
图2-11 嗜线虫致病杆菌北京变种pLA2917接合子的质粒稳定性

Fig 2-11 Plasmid stability of pLA2917 Transconjugant of *X.*

nematophila var. *Pekingensis*

2.3.3.5 转移接合子对色素的吸收

质粒 pSZ21 和 pLA2917 的转移接合子，在 NBTA 上菌落颜色暗红，与野生型 II 型菌株相似。本实验将已经分别转有质粒 pSZ21 和 pLA2917 的转移接合子与没有质粒转化的空白对照进行比较，结果显示，两种转移接合子的色素吸收能力已经发生了改变，在 NBTA 上菌落颜色暗红，与嗜线虫致病杆菌北京变种野生型 II 型菌株较为相似。但是，它们的菌落湿润性与空白对照及野生型相比并没有发生变化。同时，在颜色和菌落形态上 pSZ21 和 pLA2917 两类转移接合子之间都没有明显的差异（图 2-12）。



A,B: Control C,D: pSZ21 transconjugants E,F: pLA2917 transconjugants

图2-12嗜线虫致病杆菌北京变种转移接合子对色素的吸收

Fig 2-12 Dye absorption of transconjugants of *X. nematophila* var. *pekingensis*

2.3.3.6 转移接合子的代谢及生化特征

pSZ21 接合子和 pLA2917 接合子细胞代谢途径均发生了显著的变化(如图 2-13 所示)。在糖类利用上，转移接合子对葡萄糖(GLU)、甘露醇(MAN)、山梨醇(SOR)、鼠李糖(RHA)、密二糖(MEL)和阿拉伯糖(ARA)都由空白对照的阴性变成了阳性；而且两类转移接合子还一致产生了β-半乳糖苷(ONPG)、赖氨酸脱羧酶(LDC)和吲哚(IND)活性。唯一不同的是 pLA2917 接合子产生了微弱的蔗糖(SAC)水解活性，而 pSZ21 接合子和对照一样呈阴性反应。另外，值得注意的是，转移接合子的 VP 反应能力大大降低了。在对两类转移接合子过氧化氢酶进行测试时发现，它们没有发生变化，和野生型菌株一样呈阴性。详细结果见表 2-10。



图2-13 嗜线虫致病杆菌北京变种转移接合子的细胞代谢反应

Fig 2-13 Metabolism activities of transconjugants from *X. nematophila* var. *pekingensis*

表 2-10 嗜线虫致病杆菌北京变种转移接合子的细胞代谢及生化反应

Table 2-10 Metabolism and biochemical activity of transconjugants of *X. nematophila* var. *pekingensis*

	pSZ21 接合子	pLA2917 接合子	空白处理
	pSZ21 transconjugant.	pLA2917 transconjugant.	Blank
β-半乳糖苷(ONPG)	+	+	-
精氨酸双水解酶(ADH)	-	-	-
赖氨酸脱羧酶(LDC)	+	+	-
鸟氨酸脱羧酶(ODC)	-	-	-
枸橼酸盐(CIT)	-	-	-
硫化氢(H ₂ S)	-	-	-
尿素(URE)	-	-	-
色氨酸脱羧酶(TDA)	+	+	-
吲哚(IND)	+	+	-
V, P	+/-	+/-	+
明胶(GEL)	-	-	-
葡萄糖(GLU)	+	+	-
甘露醇(MAN)	+	+	-
肌醇(INO)	-	-	-
山梨醇(SOR)	+	+	-
鼠李糖(RHA)	+	+	-
蔗糖(SAC)	-	+/-	-
蜜二糖(MEL)	+	+	-
苦杏仁甙(AMY)	-	-	-
阿拉伯糖(ARA)	+	+	-
过氧化氢酶(Catalase)	-	-	-

注：+ 阳性反应 - 阴性反应 +/- 弱阳性反应

2.3.3.7 转移接合子的生长曲线变化

经过接合转移将外源质粒导入嗜线虫致病杆菌北京变种菌株细胞后，菌株的生长曲线也发生了较大的变化。无论是 pSZ21 接合子，还是 pLA2917 接合子，其生长速度均明显高于空白对照菌株。由图 2-14 可以看出，两类转移接合子均提前进入指数生长期，在接种后 12 h 就达到稳定期，比生长相对平稳的空白对照整整提早了 12 小时。但是，从稳定期的细菌含量来看，pSZ21 和 pLA2917 转移接合子的菌液浓度要小一些，接种后 24 小时二者的 OD₆₀₀ 吸收值分别比空白对照低 13.9% 和 13.7%。在以后的继续培养中，各菌液浓度始终保持了各自相对稳定的水平。

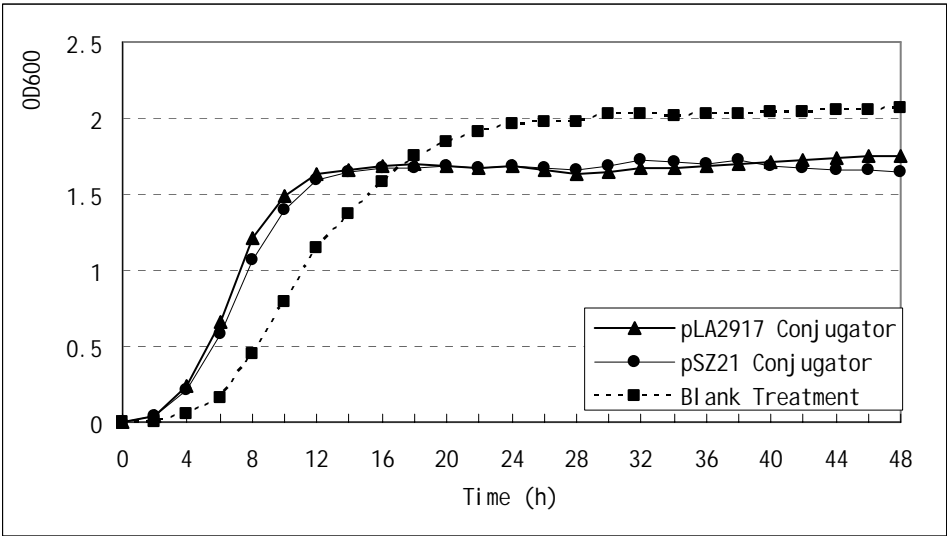


图2-14嗜线虫致病杆菌北京变种转移接合子的生长曲线

Fig 2-14 Growth curve of transconjugants of *X. nematophila* var. *pekingensis*

2.3.3.8 转移接合子的抑菌活性

pLA2917 转移接合子和 pSZ21 转移接合子的抑菌活性均大幅度下降。从嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株 pSZ21 转移接合子中随机挑取 123 个克隆，分别接种在 LB 液体培养基中，28℃，180rpm 培养，发酵液用于抑菌试验测定。结果表明，pSZ21 转移接合子的抑菌活性降低幅度相当大。抑菌圈直径最大为 21.80 mm，最小为 9.75 mm，平均为 14.36 mm。从图 2-15 这些转移接合子抑菌圈直径的频率分布来看，直径为 13.00~13.99 mm 的菌株所占比例最大，为 25.3%；其次，直径 14.00~14.99 mm 和 12.00~12.99 mm 的菌株分别占 19.1%和 16.0%。也就是说，抑菌圈直径在 12.00~15.99 mm 的菌株在所有 pSZ21 接合子中的百分数为 73.0%，直径大于 16.00 mm 的接合子仅为 8.9%。这说明，当外源 pSZ21 质粒进入嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌细胞中以后，对该菌株的产素能力起到相当大的抑制作用。

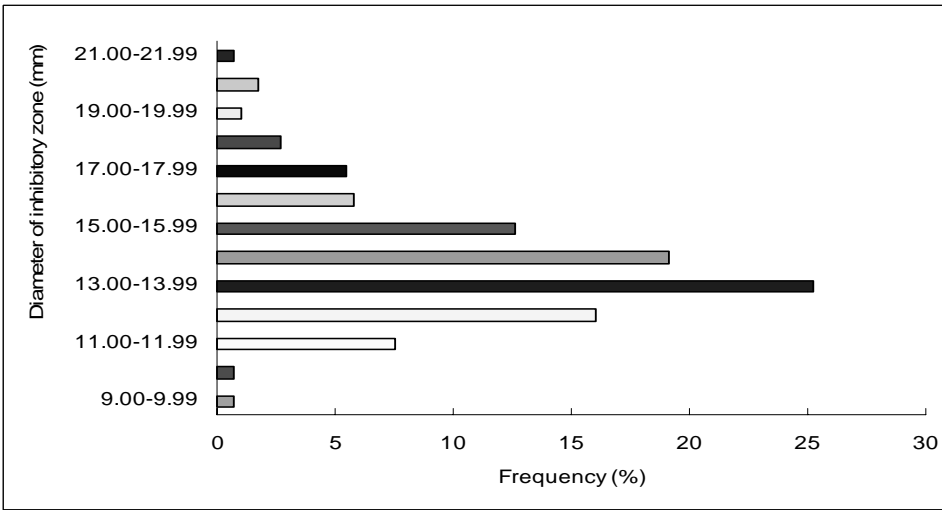


图2-15 嗜线虫致病杆菌北京变种pSZ21转移接合子抑菌圈直径的频率分布

Fig 2-15 Frequency distribution of pSZ21 transconjugants of *X. nematophila* var. *pekingensis*

嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株 pLA2917 转移接合子的抑菌活性与 pSZ21 转移接合子的一致，抑菌圈直径的平均值仅为 13.98 mm。从图 2-16 可以看出，其活性同样比野生型菌株要小得多。

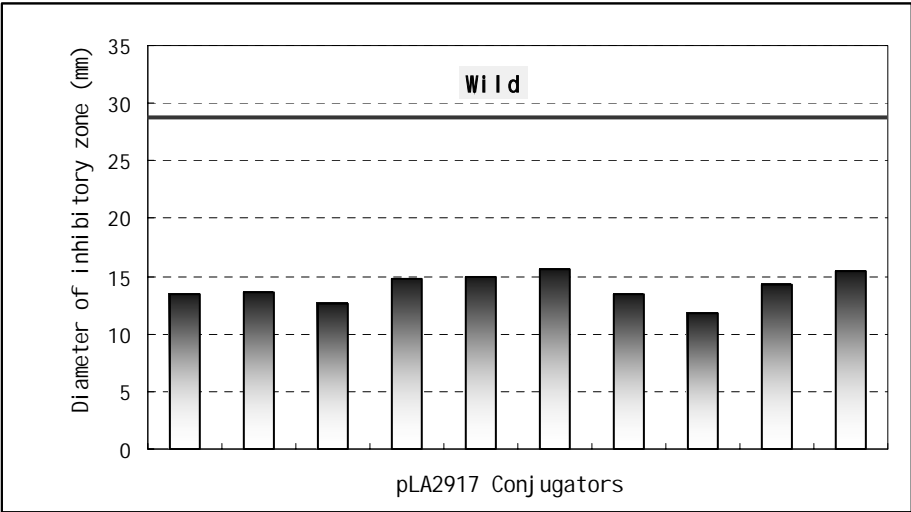


图2-16 嗜线虫致病杆菌北京变种pLA2917转移接合子的抑菌圈直径

Fig 2-16 Diameter of inhibitory zone of pLA2917 transconjugants of *X. nematophila* var. *pekingensis*

2.3.3.9 pSZ21转移接合子的氯霉素抗性

质粒 pSZ21 本身是一种自杀性质粒。由质粒结构图谱可知，该质粒含有一个 Tn5 转座子，在一般的转座子诱导突变过程中，带有卡那霉素抗性的 Tn5 转座子可以随机插入到基因 DNA 序列的不同位置，使相应的基因失活，从而得到含有各种变异基因的突变体库。同时，该质粒本身不能在宿主细胞中繁殖存活。本实验最初的研究思路曾期望由 pSZ21 接合转移筛选的卡那霉素抗性转化子是仅仅含有 Tn5 转座子的突变体库。但是由于在 2.3.3.4 实验中发现质粒 pSZ21 同样存在于嗜线虫致病杆菌的转移接合子中，所以需要对比自杀性质粒的存在进行进一步验证。实验结果如表 2-11 所示，嗜线虫致病杆菌北京变种 pSZ21 转移接合子不但可以耐受基因工程操作常用的 25 $\mu\text{g/ml}$ 的氯霉素含量，甚至在 170 $\mu\text{g/ml}$ 的高浓度下，菌落同样能够生长。表明完整的 pSZ21 质粒能够在嗜线虫致病杆菌北京变种接合子中存活并繁殖，再次印证了前面 2.3.3.4 的实验结果。

表 2-11 嗜线虫致病杆菌北京变种 pSZ21 转移接合子的氯霉素抗性测定

Table 2-11 Chloramphenicol resistance of pSZ21 transconjugant of *X. nematophila* var. *pekingensis*

浓度 (Concentration)	转移接合子生长情况 Growth status of pSZ21 transconjugant
170 $\mu\text{g/ml}$	+
25 $\mu\text{g/ml}$	+
10 $\mu\text{g/ml}$	+
5 $\mu\text{g/ml}$	+

注： + 生长 - 不生长

2.3.4 讨论

2.3.4.1 北京变种遗传转化体系的构建

将外源质粒转入受体细胞常用的方法主要有电击法和 CaCl_2 介导的化学转化法。本实验室也在嗜线虫致病杆菌北京变种菌株上尝试过这两种方法,但一直没有转化成功(数据未发表)。分析其原因,可能正如上一节研究提到的,由于在制备感受态细胞的过程中,使该菌株的细胞特性发生了改变,从而不利于外源遗传物质的导入。与电击法和化学转化法相比较,在接合转移操作过程中,所有的处理显得更为简单温和,对受体细胞的影响更小一些,所以本试验用此法将质粒成功地转移到嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型细胞并且稳定存在。该遗传转化体系的成功构建,将为昆虫病原线虫共生细菌的分子生物学研究尤其对相关基因的功能鉴定提供一种有效的实验技术,在国内尚属首次报道。

2.3.4.2 外源质粒导入对北京变种 I 型菌株代谢的影响

通过对转化接合子各方面特性的检测,可以看出由于外源质粒的导入,使嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株的细胞代谢也发生了相应的变化。在 NBTA 培养基中,无论是 pSZ21 接合子还是 pLA2917 接合子,它们的颜色都由野生型的深蓝色转变为暗红色。生长曲线显示接合子的生长速度要明显高于空白对照菌株。两类转化接合子均提前进入指数生长期,在接种后 12 h 就达到稳定期,比对照整整提早了 12 小时。而在用 API 20E 试条测试的生化反应中,转化接合子与对照相比发生了变化。特别在对各种糖类的利用上,含有外源质粒的转化接合子的影响甚至要比电击转化和化学转化对空白菌株的影响还要大。至于更为令人关心的抑菌活性,结果显示转化接合子的抗生素效价出现普遍降低。总之,外源遗传物质的导入,对嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株细胞的许多代谢途径及性状产生了较大的影响。

迄今为止,直接以致病菌菌株为受体细胞进行基因工程操作的报道不多,有些报道对获得的致病杆菌属细菌工程菌株的生理生化特性进行过描述。Xu 等(1991)运用 Tn5 转座子诱变嗜线虫致病杆菌(*X. nematophila* ATCC 19061),分离出 250 多个插入突变体,发现了溴百里酚兰吸收、红细胞溶解能力、抗生素产生能力、以及对 *Galleria mellonella* 毒力都发生了改变。Matthew 等(1993)用 Tn10 衍生转座子因子构建波氏致病杆菌(*X. bovienii*)的插入突变体。分离的突变体其蛋白酶、脂肪酶、DNase、色素结合能力、溶血活性发生了改变,同时他们还得到一系列的营养缺陷突变体。Pinyon 等(1996)将 Tn5 衍生物用于构建波氏致病杆菌(*X. bovienii*) T228/1 稳定的插入突变体。分离的突变体的刚果红结合能力、氨苄青霉素抗性、溶血活性和卵磷脂酶活性发生了改变。有的突变子失去了产生卵磷脂酶酶的能力,有的表达降低。值得注意的是,由于这些研究的出发点是直接从转座子突变体库中寻找感兴趣的基因,所以并没有以不含转座子的质粒作为对照进行研究。而且目前还没有细胞杀虫、抑菌或者毒力有所提高的工程菌株的报道。而用接合转移将质粒转化到致病杆菌感受态细胞的文献报道目前只有一篇,Eric 等(2003)将含有发绿荧光蛋白的重组质粒转化到嗜线虫致病杆菌(*X. nematophila*)菌株中并进行组成型表达,但是该报道并没有对获得工程菌株的特性进行论述。本研究首次对含有外源质粒的嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株的生理生化特性进行了较为系统的分析。直接将载体导入受体细胞,操作相对简单,对受体菌的染色体遗传背景影响也相对要小一些。在理想状态下研究细胞的代谢变化,得到的结果具有更强的可参考性,这在国内外尚属首次。

2.3.4.3 pSZ21 转化接合子的抑菌活性降低不一定由 Tn5 转座子引起

转座子诱变是研究许多革兰氏阴性细菌的一种重要的工具 (Bao, 1991)。pSZ21 是由沈炳福构建的带有 mob 基因和转座子 Tn5 插入的自杀性质粒载体, 已经在肺炎克氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)、固氮斯氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)等菌株中用于突变体文库的构建 (沈炳福等, 1995; 闫春玲 等, 2003b)。本研究最初曾期望利用自杀性质粒 pSZ21 的 Tn5 转座子构建该菌株的突变体库, 然后根据抑菌活性的强弱, 筛选出抗生素相关基因被 Tn5 插入失活的无抑菌活性的突变体, 或者幸运地得到抑菌活性有所增加的菌株从而找到抗生素合成的调节基因。但在研究中发现, 所有被检测的嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株转化接合子无一例外地呈现出抑菌活性降低的态势, 使突变体库的筛选带来了难度。由于卡那霉素抗性基因位于 Tn5 转座子上, 所以通过选择培养基筛选和 PCR 扩增鉴定只能保证转化接合子细胞内含有 Tn5 转座子。进一步的实验显示, 从接合子中提取得到的质粒和对照 pSZ21 一致, 而且接合子表现出来的氯霉素抗性进一步证实除了 Tn5 转座子而外, 整个 pSZ21 质粒都在转化接合子中。也就是说, 受体菌嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型细胞本身可以表达自杀质粒 pSZ21 复制所需的相关蛋白, 从而使 pSZ21 在转化接合子中以环形质粒的形式不断复制。然而所有接合子的产素能力都不同程度降低的原因是什么呢? 是由于不稳定的 Tn5 转座子在染色体 DNA 不同位点上不断随机插入引起的, 还是由于外源质粒的导入所致? 为了进一步了解接合转移对受体细胞的影响, 本实验以不含转座子的 pLA2917 作为供体质粒, 研究了该质粒在嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型细胞中的转化。

pLA2917 是严紧型并具有广泛寄主范围转移特性的质粒载体。它能自主接合转移到广泛的革兰氏阴性细菌中, 并能在细菌中稳定存在 (Allen, 1985)。从实验结果可以看出, 嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株的 pLA2917 转化接合子无论是在色素吸收、生长曲线模式、生理生化活性变化, 还是在抗生素产素水平上, 始终都与 pSZ21 转化接合子保持着较强的一致性。这表明, 嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株的 pSZ21 转化接合子发生的生理生化特性和抑菌活性的变化不一定是由 Tn5 的转座插入引起的。至于 Tn5 转座子在其中是否起作用目前还不清楚。

第三章 嗜线虫致病杆菌北京变种抗生素抗性相关基因的研究

由前人研究可知,嗜线虫致病杆菌北京变种难以用物理、化学以及生物的方法直接得到稳定高产的改良工程菌株。而且,如果要用基因工程手段对该菌株进行操作,必须要对其所产生抗生素的代谢途径有比较清楚的了解。目前,虽然国内外已经对致病杆菌次生代谢物的抗生素活性、成分及其结构有了一定的研究,而且从嗜线虫致病杆菌北京变种中鉴定到抗生素的成分有苯并吡喃类和吲哚类,但是尚无任何关于致病杆菌抗生素生物合成基因的直接报道。

迄今为止,已从不同的链霉菌菌株中克隆到次甲基霉素 A、新霉素、硫链丝菌素、红霉素、紫霉素、潮霉素、卡那霉素、土霉素、多霉素、链霉素、嘌呤霉素、氯霉素和利福霉素的抗性基因,发现大部分抗生素抗性基因都和合成基因紧密连锁(张蔚文, 1997a, b),这一现象的重要意义之一在于为克隆生物合成基因提供了极大的方便。本论文第二章的研究结果表明嗜线虫致病杆菌北京变种对氨基糖苷类抗生素链霉素、 β -内酰胺类抗生素氨苄青霉素和青霉素具有一定的抗性。虽然关于该菌株的抗生素合成基因和抗性基因是否紧密连锁还不清楚,但是可以为我们提供一种思路,即可以从抗生素抗性入手,对菌株抗生素的分子生物学研究进行尝试。

3.1 抗生素相关基因 *xbl* 的克隆与序列分析

近年来,生物信息学的迅速发展为分子生物学的研究提供了有力的分析工具。生物信息学在药物分子设计、解密生物芯片技术所得到的高通量数据、病理或药理学的分子生物学机制的阐明等诸多研究领域都起到了不可替代的作用(Kanehisa, 1998; Minoru & Peer, 2003)。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)是目前应用最广泛的分子生物学技术之一,尤其在生物学、医学和药学领域用于考察基因表达的变化和克隆新基因等方面。本实验利用美国国家生物信息学中心(National Center of Bioinformatics, NCBI)数据库,参考已经研究清楚的感兴趣基因,设计引物。以嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株为模板,进行 PCR 扩增,对 PCR 产物测序,并利用互联网上的免费资源进行序列分析。

3.1.1 实验材料

3.1.1.1 材料

嗜线虫致病杆菌北京变种(*X. nematophila* var. *pekingensis*)野生型 I 型菌株由本实验室分离、保存;大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α [supE55 Δ lacU169(ψ 80lacZ Δ M15)hsdR17 recA endA Nxr]感受态细胞购自博大泰克生物工程公司;pMD-18-T 载体购自 TAKARA 公司

3.1.1.2 试剂

质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自 Omega 公司;Pfu DNA 聚合酶、IPTG、X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside)和 dNTP 为 TaKara 产品;T4 DNA 连接酶为 NEB 产品。

3.1.2 实验方法

3.1.2.1 引物设计和合成

从 GenBank 中搜索能够水解氨苄青霉素的 β -内酰胺酶基因, 选择大肠杆菌 (*E. coli*) E102 菌株 ampC 型 β -内酰胺酶基因 (Accession No. AF124205), 设计的 PCR 引物如下:

P1: 5' GCG ATG CAC GAT CTG AAA 3'

P2: 5' ACC GAT ACT GGA GTT GGC AT 3'

引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

3.1.2.2 北京变种I型菌株基因片段的PCR扩增

PCR 扩增均以嗜线虫致病杆菌北京变种(*X. nematophila* var. *pekingensis*) I 型菌株制备的菌液作为模板来进行。

反应体系同 4.2.4。

xb1 降落 PCR 反应程序:

1	94	预变性 DNA	5 min
2	94	变性	1 min
3	52	退火	1 min
	-1	per cycle	
4	72	延伸	1.5 min
5	Go to 2, 8 cycles		
6	94	变性	1 min
7	45	退火	1 min
8	72	延伸	1.5 min
9	Go to 6, 32 cycles		
10	72	充分延伸	10 min

反应结束后进行琼脂糖凝胶电泳, 检测。

3.1.2.3 PCR产物的纯化、连接和转化

A) PCR 产物的纯化

按照 Omega 公司试剂盒 E.Z.N.A Gel Extraction Kit 的说明书进行。

- 1) 从琼脂糖胶上分别切下含目的片断的胶, 称其重量。
- 2) 加入一定体积的 Binding Buffer, 每克胶重加入 1ml 结合缓冲液。
- 3) 55-65 水浴 7 min, 溶解胶。每 2-3min 振荡混合一次, 使其混合均匀。检查混合物的颜色是否为黄色。
- 4) 将以上混和液转入 HiBind DNA 离心柱中, 套入 2ml 收集管中。
- 5) 8,000-10,000 \times g 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液。
- 6) 将纯化柱重新套入废液收集管中, 加入 300ul Binding Buffer, 10,000 \times g 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液。
- 7) 加入 700ul SPW Buffer, 放置 2-3 min, 10,000 \times g 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液。

- 8) 重复第(7)步。
- 9) 将不含任何缓冲液的离心柱 10,000×g 离心 1 min。
- 10) 取出纯化柱, 将其套入一个干净的 1.5ml 离心管, 加入 30-50ul Elution Buffer 或超纯水, 10,000×g 离心 1 分钟。
- 11) 离心管中收集的液体即是洗脱下来的质粒 DNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其纯度并目测定量。 -20℃ 保存备用。

B) PCR 产物加 “A” 反应

- 1) 在微型离心管中制备下表连接反应液, 72℃ 反应 15min。

PCR 产物加“A”反应体系		
纯化的 PCR 产物	10	μl
10×PCR buffer	2	μl
dNTP (10 uM)	0.4	μl
Taq DNA (2U/ul)	0.5	μl
去离子水	7.2	μl
总体积	20	μl

- 2) 反应结束后, 加入 2 倍体积的无水乙醇, -20℃ 冰箱沉淀 20 分钟。
- 3) 13,000rpm 离心 10 分钟, 弃上清。
- 4) 用 80% 乙醇冲洗一次, 自然风干。
- 5) 加入 10 ul TE 或者超纯水溶解

C) PCR 产物连接反应

在 200μl 离心管中制备下列连接反应液, 16℃ 反应 4-5h。

PCR 产物连接反应体系	
pMD 18-T Vector	1 μl
PCR 产物	1 μl
H ₂ O	7 μl
T4 DNA 连接酶 (3U/ul)	1 μl
总体积	10 μl

D) 连接产物转化大肠杆菌 DH5 感受态细胞

按照博大泰克生物工程公司的产品说明书进行。

- 1) 取待转化的连接产物 5μl, 试剂 A 10μl, 无菌水稀释至 50μl, 冰上备用。
- 2) 取 50μl 感受态细胞加入上述 DNA 连接溶液中, 冰浴 30min。
- 3) 室温放置 10min。
- 4) 加入 500μl LB 培养基, 37℃, 150rpm 震荡 10~40min。
- 5) 取 100~500μl 涂于含有 X-gal、IPTG、Amp 的 LB 琼脂培养基上, 37℃ 培养过夜。
- 6) 挑取白色菌落, 培养于含 Amp 的 LB 培养液中, 37℃, 200rpm 震荡培养 12h。

7) 使用菌体 PCR 法和载体提取法确定 T 载体中插入片段。

3.1.2.4 阳性克隆的确定

A) 菌体 PCR 法确定 T 载体中插入片段

反应程序同 2.3.2.4。

B) 载体提取法确定 T 载体中插入片段

质粒提取同 2.3.2.5

3.1.2.5 序列测定

由上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定。

3.1.3 结果与分析

3.1.3.1 *xbI* 基因片段的 PCR 扩增

从 GenBank 中搜索能够水解氨苄青霉素的 β -内酰胺酶基因，选择大肠杆菌 (*E. coli*) E102 菌株 ampC 型 β -内酰胺酶基因 (Accession No. AF124205)，其序列见图 3-1。

```

1  cgtatgcacc acgcatgca cgatctgaaa attcacgtgc ctgcgggcaa atgggttttc
61  tacggtcttg ctgctatctt gacagttgtc acgctgattg gtatcgttac aatctaacgt
121 atcgccaatg taaatccggc ccgcctatgg cgggccgttt tgtatggaaa ccagacctta
181 tgttcaaaac gacgctctgc gccttattaa ttaccgcctc ttgctccaca ttgctgccc
241 ctcaacaaat caacgatatt gtgcatcgca caattacccc gcttatagag caacaaaaga
301 tccccggtat ggcggtggcg gtaatttatc agggtaaacc ttattacttt acctggggct
361 atgcggacat cgcaaaaag cagcccgtca cacagcaaac gttgtttgag ttaggttcgg
421 tcagcaaaac atttacgggc gtgcttggtg gcgacgctat tgctcgaggg gaaatcaagt
481 taagcgatcc cgcaacaaaa tactggcctg aacttaccgc taaacagtgg aatgggatca
541 cactattaca tcttgcgacc tacaccgtg gcggcctgcc attgcaggtg ccggatgaag
601 tgaaatcctc aagcgacttg ctgcgcttct atcaaaactg gcagcctgca tgggctccag
661 gaacacaacg tctgtatgcc aactccagta tcggtttggt cggcgcactg gctgtgaagc
721 cgtctgggtt gagttttgag caggcgatgc aaactcgtgt cttccagcca ctcaaaactca
781 accatacgtg gattaatgta cctccccag aagaaaagaa ttacgcctgg ggatatcgcg
841 aaggtaaggc agtgcattgt tcgccagggg cgttagatgc tgaagcttat ggtgtgaagt
901 cgaccattga agatatggcc cgctgggtac gaagcaatat gaatccccgt gatatcaacg
961 acaaaacact tcagcaaggg atacaactgg cacaatctcg ctactggcaa accggcgata
1021 tgtatcaggg cctgggctgg gaaatgctgg actggccggt aaatcctgac agcatcatta
1081 acggcaatgg caataaaatt gcactggcag cacaccctgt aaaagcgatt acgcccccaa
1141 ctctctcagt acgcatca tgggtacata aaacaggggc aaccggcgga ttggttagct
1201 atgtcgcgtt tattccagaa aaagagctgg gtatagtgat gctggctaac aaaaactatc
1261 ccaatccagc gagagtcgcc gccgcctggc agattctcaa cgctctacag taa

```

图3-1 大肠杆菌E102菌株ampC型 β -内酰胺酶基因的核苷酸序列

Fig 3-1 Nucleotide sequence of beta-lactamase ampC gene of Escherichia coli E102

根据以上序列,利用 DNAMAN 软件设计引物,正向引物 P1 为 13-30 碱基之间序列,反向引物 P2 为 676-695 碱基之间序列。以嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型细胞菌体为模板,进行 PCR 扩增。结果显示,P1 和 P2 组成的引物对能够得到扩增产物(如图 3-2),并将其命名为 *xbl* 基因片段。



M: Marker 1: PCR product of *xbl* gene fragment

图3-2 嗜线虫致病杆菌北京变种I型菌中*xbl*基因片段的PCR扩增

Fig 3-2 PCR amplification of *xbl* fragment from Form I of *X. nematophila* var. *pekingensis*

3.1.3.2 *xbl* 基因片段的测序

将以上 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳回收,纯化,克隆到 T-vector 中,菌落 PCR 确定目的片段已经转入载体。由上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定,得到 *xbl* 基因片段的核苷酸序列如图 3-3。从序列测定结果可以看出,*xbl* 基因片段为 745bp,核苷酸组成为 204 A, 195 C, 164 G, 和 182 T。G+C 含量为 48.2%。

```

1      ACCGATACTG GAGTTGGCAT CGATCACTGA CTCTGTTTGT CCATAGATAT TGAAACAACG
61     GGCATCAGTA TGAATCCGCT TTTGCAAACG GCTCAGATCA CGCCCGTACC AGGCTTCGGA
121    ACCCACTAAT ATGGTGCGCA GTGAATTCAA CTGAACCTTA TTTTGTTCAG CATAATCGAG
181    TAAATTTCTC AGAATGACCG GCACAAAATC ACCAAATGTC ACGTGTGTGT GTTCAATCAG
241    CTGATACAAC ACATCTGTGG TGATCAGATC TGATTTGCGA CAAATGACCA GGCGTCCCCC
301    CGTGGTCAGG CTCTTAACGA TATCGCCCAG AAAGATATCC ACAGCCAGAC CCGCCATCTG
361    CAAGATAGTT GGCGGCTTCT GGAATAAGCC AAATACCGCA TCCCAACCAT ATAAACGGCC
421    GATCATTGCC GTGTGTTCAA CCATGACGCC TTTAGGATGG CCCGTTGTGC CTGAGGTGTA
481    AGTCATGTAA GCCAGATGGG TCGCGGTTGA ATGGTTTTGT GTCACCGCAA TATTGGTATC
541    AATTTGCGAC TGACTTAATA TTTCAATCAA TCGCCAAACT TCGTACTCCG GATCCACCGC
601    AGCAGGCAAA CGCTGAATAT CATCAACCAC AATCAGGGGA GTGCCGCTAT CTTGCAGCAG
661    ATATTCATC CGCGGCGCTG GCAGATCAGT ATCAAACGGC ACATAGGCTA AACCCGCCTT
721    CAAGATGCCA ACTCCAGTAT CGGTA

```

图3-3 嗜线虫致病杆菌北京变种I型菌株*xbl*基因片段的核苷酸序列

Fig 3-3 Sequence of *xbl* fragment from Form I of *X. nematophila* var. *pekingensis*

3.1.3.3 *xbl* 基因片段的序列分析

在 NCBI 中对 *xbl* 基因片段进行 blastn 比对,结果如图 3-4。从比对结果可以看出,在 GenBank 中与 *xbl* 基因序列同源性最高的是来自发光杆菌(*Photobacterium luminescens*) TTO1 菌株的基因。其核苷酸序列比对 Blastn 显示,*xbl* 基因的 17-731 碱基与发光杆菌基因组中的 316961-317675 碱基位点具有 85% 的序列相似性。将 *xbl* 基因推测的氨基酸序列进行 blastp 比对,结果显示:*xbl*

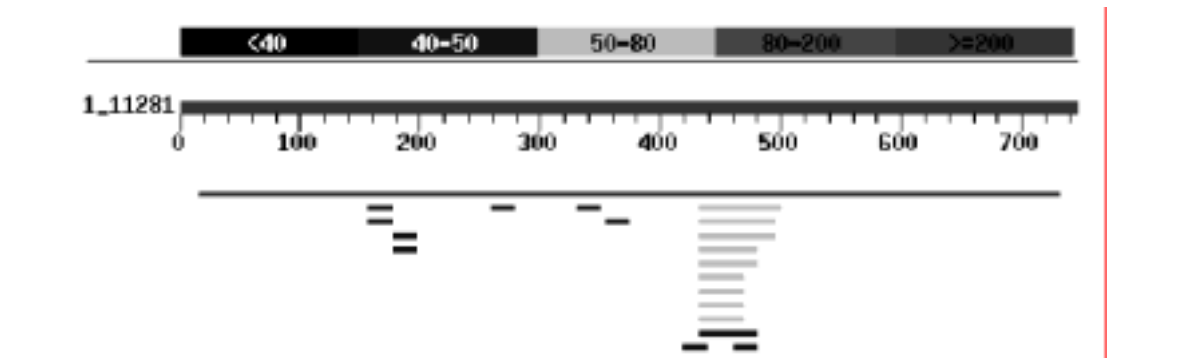


图 3-4 *xbl*基因片段的序列比对

Fig 3-4 Alignment of *xbl* fragment sequence

编码的氨基酸序列同样和发光光杆菌的未命名蛋白具有最高为 85 %的同源性；与虫媒假单胞菌（*Pseudomonas entomophila*）的非核糖体多肽合成酶模块及相关蛋白氨基酸序列的同源性为 37 %；与丁香假单胞菌（*Pseudomonas syringae*）的丁香霉素合成酶同源性为 36 %；与短短小芽孢杆菌（*Brevibacillus brevis*）短杆菌肽 S 合成酶 II 具有 32 %的同源性。图 3-5 显示嗜线虫致病杆菌北京变种 *xbl* 基因片段推测编码氨基酸序列的同源性聚类分析，结果表明嗜线虫致病杆菌北京变种与发光光杆菌的同源性最高。

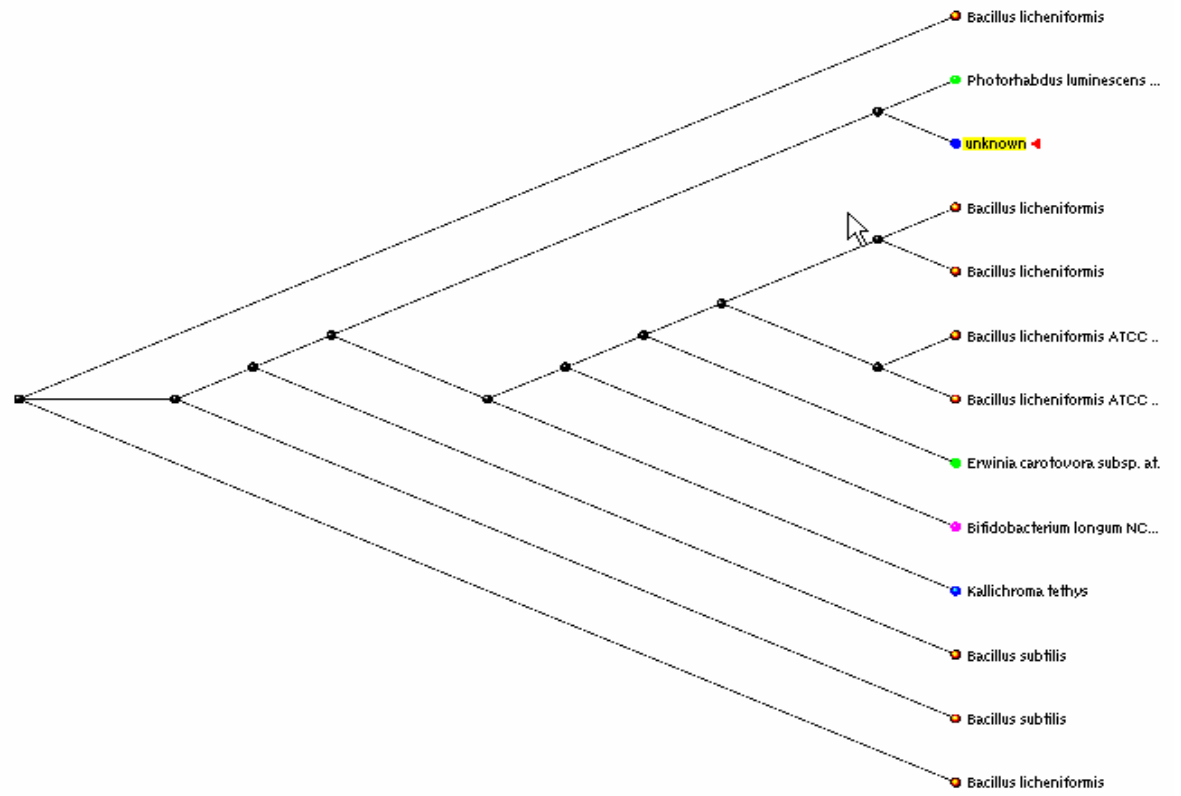


图 3-5 *xbl*基因片段推测编码氨基酸序列的同源性聚类分析

Fig. 3-5 Neighbor joining phylogeny of putative peptide encoded by *xbl* fragment

进一步对发光光杆菌的对应序列进行定位，发现相应基因编码的蛋白虽然没有命名，但是推测该蛋白与抗生素生物合成相关蛋白相类似。由于致病杆菌属和发光杆菌属分类地位均属肠杆

菌科，它们的亲缘关系最近，因此可以预知，本实验克隆到的嗜线虫致病杆菌北京变种菌株 *xbl* 基因片段与抗生素相关基因具有一定联系。

在 www.xenorhabdus.org 服务器上，将本实验克隆的嗜线虫致病杆菌北京变种 *xbl* 基因与 ATCC19061 菌株的核苷酸序列进行 blastn 比对，结果如图 3-6 所示。

```

Query: 15      tggcatcgatcactgactctgtttgtccatagatattgaaacaacgggcatcagtatgaa 74
              |||
Sbj ct: 2354968 tggcatcgatcactgactctgtttgtccatagatattgaaacaacgggcatcagtatgaa 2355027

Query: 75      tccgcttttgcaaacggctcagatcacgcccgtaccaggcttcggaaccactaatatgg 134
              |||
Sbj ct: 2355028 tccgcttttgcaaacggctcagatcacgcccgtaccaggcttcggaaccactaatatgg 2355087

Query: 135      tgcgcagtgaaattcaactgaaccttattttgttcagcataatcgagtaaatttctcagaa 194
              |||
Sbj ct: 2355088 tgcgcagtgaaattcaactgaaccttattttgttcagcataatcgagtaaatttctcagaa 2355147

Query: 195      tgaccggcacaaaatcaccaaatgtcacgtgttgttcaatcagctgatacaacacat 254
              |||
Sbj ct: 2355148 tgaccggcacaaaatcaccaaatgtcacgtgttgttcaatcagctgatacaacacat 2355207

Query: 255      ctgtggtgatcagatctgatttgcgacaaatgaccaggcgtcccccggtggtcaggctct 314
              |||
Sbj ct: 2355208 ctgtggtgatcagatctgatttgcgacaaatgaccaggcgtcccccggtggtcaggctct 2355267

Query: 315      taacgatatcgcccagaagatatccacagccagcccgccatctgcaagatagttggcg 374
              |||
Sbj ct: 2355268 taacgatatcgcccagaagatatccacagccagcccgccatctgcaagatagttggcg 2355327

Query: 375      gcttctggaataagccaataaccgcatccaaccatataaacggccgatcattgccgtgt 434
              |||
Sbj ct: 2355328 gcttctggaataagccaataaccgcatccaaccatataaacggccgatcattgccgtgt 2355387

Query: 435      gttcaaccatgacgccttaggatggccggttgcctgagggtgaagtcatgtaagcca 494
              |||
Sbj ct: 2355388 gttcaaccatgacgccttaggatggccggttgcctgagggtgaagtcatgtaagcca 2355447

Query: 495      gatgggtcgcggttgaatggtttgtgtcaccgcaatattggatcaatttgcgactgac 554
              |||
Sbj ct: 2355448 gatgggtcgcggttgaatggtttgtgtcaccgcaatattggatcaatttgcgactgac 2355507

Query: 555      ttaatatattcatccaatcgccaaacttcgtactccggatccaccgcagcaggcaaacgct 614
              |||
Sbj ct: 2355508 ttaatatattcatccaatcgccaaacttcgtactccggatccaccgcagcaggcaaacgct 2355567

Query: 615      gaatatcatcaaccacaatcaggggagtgccgctatcttgacgagatattcaatccgcg 674
              |||
Sbj ct: 2355568 gaatatcatcaaccacaatcaggggagtgccgctatcttgacgagatattcaatccgcg 2355627

Query: 675      gcgctggcagatcagtatcaaacggcacataggctaaacccgccttcaagatgcaa 731
              |||
Sbj ct: 2355628 gcgctggcagatcagtatcaaacggcacataggctaaacccgccttcaagatgcaa 2355684
  
```

图3-6 北京变种*xbl*基因核苷酸序列与ATCC19061菌株的blastn比对

Fig 3-6 Blastn alignment of *xbl* fragment to ATCC19061 strain

从上图可以看出 *xbl* 基因片段的 15~731 碱基与 ATCC19061 菌株对应区域同源性达 99%。两个菌株之间只有 3 个碱基发生了变异, 即北京变种的 G₁₃₆、A₃₄₉ 发生了置换, 在 ATCC19061 菌株中分别 A₂₃₅₅₀₈₉ 和 G₂₃₅₅₃₀₂ 所代替。而北京变种的碱基 T₅₈₇ 则发生了颠换, 在 ATCC19061 菌株中为 G₂₃₅₅₅₄₀。这三个碱基变异方式的不同直接导致了它们编码氨基酸的种类出现了差异。从 blastp 比对结果看来, *xbl* 基因的碱基 G₁₃₆ 和 A₃₄₉ 虽然在 ATCC19061 菌株中发生置换, 但是它们各自对应编码相同的氨基酸; 相反, *xbl* 基因的 T₅₈₇ 所在的三联体密码子 (GAG) 编码的氨基酸为谷氨酸 (Glu, E), 而 ATCC19061 菌株中, 对应的 GCG 为编码丙氨酸 (Ala, A) 的密码子 (图 3-7)。

```
Query: 5   VGI LKAGLAYVPFD TDL PAPRI EYLLQDSGTPLI VDDI QRLPAAVDP EYEVWRLDEI LS 64
          +GI LKAGLAYVPFD TDL PAPRI EYLLQDSGTPLI VDDI QRLPAAVDP YEVWRLDEI LS
Sbjct: 1662 LGI LKAGLAYVPFD TDL PAPRI EYLLQDSGTPLI VDDI QRLPAAVDP EYEVWRLDEI LS 1721

Query: 65   QSQI DTNI AVTQNHSTATHLAYMTYTS GTTGHPKGMVEHTAMI GRLYGWDAVFGFLFQKP 124
          QSQI DTNI AVTQNHSTATHLAYMTYTS GTTGHPKGMVEHTAMI GRLYGWDAVFGFLFQKP
Sbjct: 1722 QSQI DTNI AVTQNHSTATHLAYMTYTS GTTGHPKGMVEHTAMI GRLYGWDAVFGFLFQKP 1781

Query: 125   PTI LQAGLAVDI FLGDI VKSLTTGGRLVI CRKSDLI TTDVLYQLI EQQHVTFGDFVFPVI 184
          PTI LQAGLAVDI FLGDI VKSLTTGGRLVI CRKSDLI TTDVLYQLI EQQHVTFGDFVFPVI
Sbjct: 1782 PTI LQAGLAVDI FLGDI VKSLTTGGRLVI CRKSDLI TTDVLYQLI EQQHVTFGDFVFPVI 1841

Query: 185   LRNLLDYAEQNKVQLNSLRTI LVGSEAWYGRDLSRLQKRI HTDARCFNI YGQTESVI DAN 244
          LRNLLDYAEQNKVQLNSLRTI LVGSEAWYGRDLSRLQKRI HTDARCFNI YGQTESVI DA+
Sbjct: 1842 LRNLLDYAEQNKVQLNSLRTI LVGSEAWYGRDLSRLQKRI HTDARCFNI YGQTESVI DAS 1901
```

图3-7 北京变种*xbl*基因核苷酸序列与ATCC19061菌株的blastp比对

Fig 3-7 Blastp alignment of *xbl* fragment to ATCC19061 strain

3.1.3.4 *xbl*基因序列在Genbank中的注册

将 *xbl* 基因描述为“嗜线虫致病杆菌北京变种 CB6 菌株抗生素相关基因”, 在 GenBank 提交注册 (Accession Number DQ631811)。

3.1.4 讨论

对昆虫病原线虫共生细菌的分子生物学研究, 大多集中在致病性、共生作用、生物发光、以及对极端环境的适应等机理和功能上, 因此大多基因都涉及这些功能的特性。比较而言, 对致病杆菌 (*Xenorhabdus* spp.) 的研究要晚于光杆状菌 (*Photorhabdus* spp.)。从已有的报道来看, 16S rRNA 编码基因在该细菌中研究得最早也最为普遍, 在致病杆菌属细菌的分子分类学中起到了重要作用。而关于致病杆菌功能基因的分子生物学研究, 从上世纪九十年代中后期才开始涉及。十几年来, 已报道的致病杆菌功能基因主要包括: 外膜蛋白基因、菌毛蛋白基因、共生作用相关基因以及杀虫毒素基因。由孟山都公司和威斯康星大学等组成的联合研究小组, 已经完成了伯氏致病杆菌 (*X. bovienii*) 和嗜线虫致病杆菌 (*X. nematophila*) ATCC19061 菌株的基因组测序工作。虽然这些序列还没有以免费共享资源在 NCBI 上正式公布, 但是可以预测, 致病杆菌各功能基因研究的浪潮逐渐来临。

目前在 GenBank 中检索与 *xbl* 基因序列同源性最高的是来自发光光杆状菌 (*Photorhabdus luminescens*) TTO1 菌株的基因组基因, *xbl* 基因的 17~731 碱基与发光光杆状菌基因组的 316961~

317675 碱基位点具有 85% 的序列相似性。从进一步对发光杆菌的对应序列进行定位的结果可以看出, 相应基因 312841~322656 碱基编码的蛋白虽然没有命名, 但推测该蛋白与抗生素生物合成相关蛋白相类似。另外在这个基因位点旁侧发现了抗生素相关基因的分布 (图 3-8), 其下游有三段碱基序列的编码产物均为抗生素生物合成的类似蛋白, 它们分别位于 322653~326054、326057~335869、335869~345726 碱基。而在上游, 310967~312805 碱基编码的未命名蛋白也与抗生素生物合成有关, 292259~293620 碱基编码的未命名蛋白产物类似与多药抗性蛋白。这个结果表明, 发光杆菌和链霉菌的抗生素合成基因相类似, 都是以基因簇的形式存在。由于致病杆菌属和发光杆菌属分类地位均属肠杆菌科, 它们的亲缘关系十分接近, 因此推测本实验首次克隆得到的嗜线虫致病杆菌北京变种菌株 *xbl* 基因片段与抗生素相关基因具有一定联系。

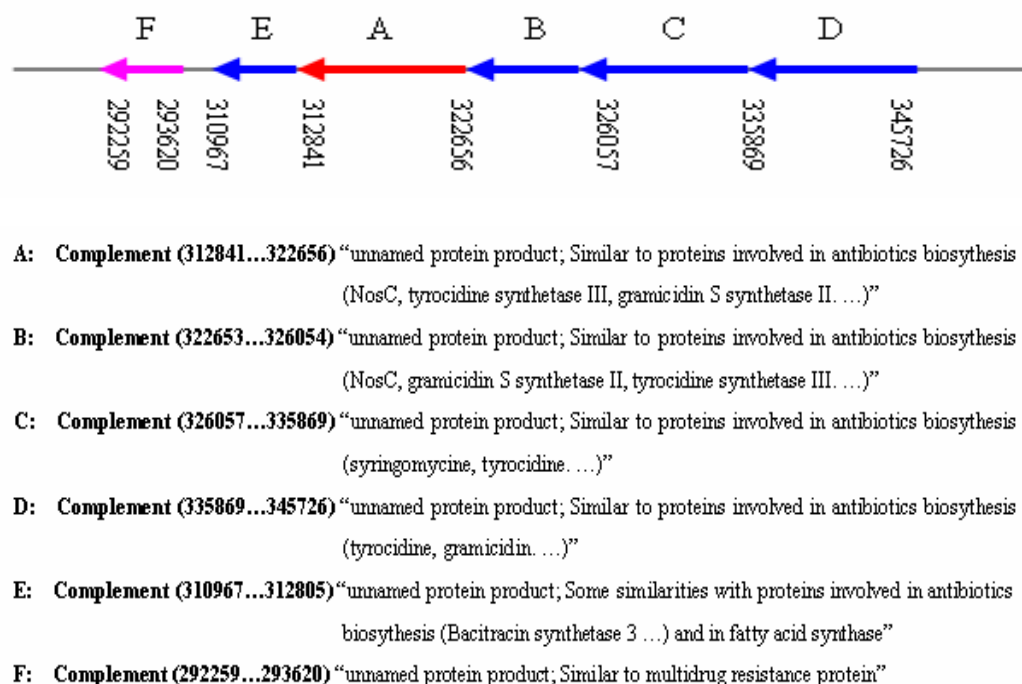


图3-8 发光杆菌抗生素相关基因的定位

Fig 3-8 Loci of antibiotics – related genes in *Photobacterium luminescens* TTO1

由于对昆虫病原线虫共生细菌抗生素相关的功能基因还未见报道, 所以要进一步对克隆的 *xbl* 基因片段的功能进行鉴定缺乏可参照的对象。但是, 由于本研究最初是从 β -内酰胺酶合成基因序列出发设计引物, PCR 扩增得到的基因片段虽然和已有的 β -内酰胺酶合成基因相似性很低, 但是可以通过对该基因类似功能的鉴定, 从而判断同功蛋白存在的可能性。以下将对 *xbl* 基因片段中的 *xbl-ah* 序列在大肠杆菌中的异源表达进行研究。

3.2 氨苄青霉素水解活性肽段 XBL-AH 的表达与纯化

关于抗生素抗性机制,现在已经鉴定出多种不同的生化途径,包括:修饰细胞外膜,降低抗生素的通透性;位于膜上的泵主动排出抗生素,使抗生素从胞间质运送到胞外环境中;正常的细胞机制发生改变,从而使抗生素的作用位点发生变化;抗生素作用位点扩增,使抗生素被稀释;截获抗生素,防止其进入细胞的作用部位;通过水解抗生素或者增加化学基团而使抗生素失活(Mazel and Davies, 1999)。而大部分抗生素抗性都源于两种以上的抗性机制。

由上一节的研究结果得知,从嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型细胞中已经克隆得到的 *xbl* 基因片段经 Blast 序列比对,结果显示该基因与发光杆菌状菌(*Photobacterium luminescens*)推测与抗生素合成相关的基因有 85% 的同源性。而且,由于该序列最初引物是参照大肠杆菌 β -内酰胺酶基因的核苷酸序列而设计的,所以预测 *xbl* 基因片段的表达产物可能与抗生素抗性可能存在某种联系。本章将嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型细胞 *xbl* 基因中高度保守的 *xbl-ah* 基因片段连接到表达载体 pET28a(+)中,尝试在大肠杆菌中进行异源表达,并对表达产物进行了纯化和功能鉴定。

3.2.1 实验材料

3.2.1.1 材料

嗜线虫致病杆菌北京变种(*X. nematophila* var. *pekingensis*) 野生型 I 型菌株由本实验室分离、保存;大肠杆菌(*E. coli*) BL21 (DE3) 感受态细胞购自博大泰克生物工程公司;pET28a(+)表达载体由本实验室保存。

3.2.1.2 常用缓冲溶液

TE (pH8.0):	10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0),
	1 mmol/L EDTA (pH8.0)
1×TAE:	40 mmol/L Tris-CH ₃ COOH,
	1 mmol/L EDTA

3.2.1.3 蛋白电泳溶液

缓冲液:

分离胶缓冲液(4×): 100 ml (pH8.8)

Tris-HCl	18.17g
SDS	0.4g
1 N HCl	48 ml
加蒸馏水定容至 100 ml	

浓缩胶缓冲液(4×): 100 ml (pH6.8)

Tris-HCl	6.06g
SDS	0.4g
1 N HCl	48 ml
加蒸馏水定容至 100 ml	

凝胶储液：100 ml

丙烯酰胺	29.2g
双丙烯酰胺	0.8g
加蒸馏水	100 ml

10%APS (过硫酸铵): 5 ml

过硫酸铵	0.5g
蒸馏水	5 ml
小量分装, -20	保存

电极缓冲液：100 ml (pH8.3)

Tris-HCl	3.03g
甘氨酸	14.41g
SDS	1g
小量分装-20	保存

上样缓冲液：100ml (pH8.0)

Tris-HCl	1.21g
甘油	10 ml
SDS	2g
巯基乙醇	0.16g
溴酚兰	0.1g
蒸馏水定容至	100 ml

考马斯亮蓝染色液：1000 ml

考马斯亮蓝 R-250	0.5g
甲醇	500 ml
乙酸	100 ml
蒸馏水	400 ml

考马斯亮蓝脱色液：1000 ml

乙酸	100 ml
蒸馏水	750 ml

配制 4 ml 12 %分离胶 (间距 1 mm 的电泳槽)

分离胶缓冲液	1.33 ml
凝胶储液	2.0 ml
双蒸水	1.6 ml
10%APS	50 μ l
10%SDS	50 μ l
TEMED	2 μ l

配制 2 ml 5%浓缩胶：

分离胶缓冲液	0.25	ml
凝胶储液	0.33	ml
双蒸水	1.4	ml
10%APS	20	μl
10%SDS	20	μl
TEMED	2	μl

3.2.1.4 试剂

质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自 Omega 公司 ;Pfu DNA 聚合酶、IPTG 和 dNTP 为 TaKaRa 产品 ;限制性内切酶购于 Promega、NEB 和 TaKaRa 公司 ;T4 DNA 连接酶为 NEB 产品 ;化学试剂 (分析纯) 购于北京化学试剂公司。

3.2.2 实验方法

3.2.2.1 表达载体的构建及诱导表达

A) pET-28a (+) 载体酶切及回收

采用 *NdeI* 和 *XhoI* 双酶切表达载体 pET-28a (+), 反应体系如下 :

pET28a(+)	5 μl
<i>NdeI</i>	1 μl
<i>XhoI</i>	1 μl
Buffer H	1 μl
H ₂ O	2 μl
总体积	10 μl

酶切产物经琼脂糖凝胶电泳, 胶回收目的片段, 具体方法见 5.2.3.1。

B) PCR 扩增 *xbl-ah* 片段

在正向引物 P3 及反向引物 P4 的 5' 端分别引入 *NdeI* 和 *XhoI* 酶切识别位点, 在两个酶切位点的 5' 端均加上保护碱基 AGCT。设计引物如下 :

P3: AGCTCATATGGATGAAATATTAAGTCAGTCGC
(*NdeI*)

P4: AGCTCTCGAG ATGAATCCGCTTTTGCAAACGGC
(*XhoI*)

引物序列中下划线序列为内切酶位点。

引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

反应体系同 4.2.4

xbl-ah PCR 反应程序 :

94	预变性 DNA	5 min
94	变性	1 min
53	退火	1 min

72 延伸 1.5 min

35 个循环后

72 充分延伸 10 min

反应结束后进行琼脂糖凝胶电泳，检测，纯化，测序。

上述 PCR 产物用 *Nde*I , *Xho*I 双酶切的反应体系如下：

<i>xbl-ah</i> PCR 产物	5 μ l
<i>Nde</i> I	1 μ l
<i>Xho</i> I	1 μ l
Buffer H	1 μ l
H ₂ O	2 μ l
总体积	10 μ l

酶切产物经琼脂糖凝胶电泳，胶回收目的片段，具体方法见 5.2.3.1。

C) pET-28a (+) 与 *xbl-ah* 连接

连接体系：

pET-28a (+)	2 μ l (约 200 ng DNA)
<i>xbl-ah</i>	1 μ l (约 100 ng DNA)
Buffer	1 μ l
T ₄ DNA ligase (3u/ μ l)	1 μ l
H ₂ O	5 μ l
总体积	10 μ l

16 连接 5h。

D) 连接产物的转化、筛选及重组子的鉴定

将连接产物转化 *E.coli* BL21 (DE3) 表达宿主菌的感受态细胞，吸取 150 μ l，涂在含有卡那霉素的 LB 平皿上筛选重组子，重组子提质粒，对重组子进行酶切鉴定。重组子命名为 pET28AH。

E) XBL-AH 的诱导表达及 SDS-PAGE 分析

将筛选获得的阳性重组质粒 pET28AH，挑取单菌落接种于 3 mL 含卡那霉素 25 μ g/ml 的 LB 液体培养基中，于 37 $^{\circ}$ C 活化过夜后，按 1 : 100 稀释加入到 50 mL 含卡那霉素 25 μ g/ml LB 液体培养基中，振荡培养至 OD₆₀₀ 值为 0.6-0.7，加入 IPTG 至一定浓度，继续在一定温度的摇床培养一定时间，并以 IPTG 诱导的 pET28a (+) 空载体为对照。

3.2.2.2 蛋白质SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳

- 1) SDS 聚丙烯酰胺凝胶的制备 参照《蛋白质技术手册》(汪家政等, 2000)将制备好的 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶先后加入安装固定好的模具中。灌胶前确保玻璃板与密封条结合紧密，不至于灌胶时露胶。加入分离胶后，胶面最好加少许水覆盖以利于胶面平齐，络合约 30 min 后，用滤纸吸干胶面上的水层。立即加入浓缩胶，插上梳子，络合约 30 min。将灌好的胶板连同支架放入电泳槽中，中间电泳槽加入的电泳缓冲液没过高低玻璃板中

的低板，将梳子拔出。

- 2) 样品处理 取生长至一定时间的活化细胞 1 ml，离心去上清后，加 80 μ l 双蒸水和 20 μ l 上样缓冲液重悬菌体，煮沸 10min，13,000 rpm 离心 10min，取上清上样或者-20 $^{\circ}$ C 保存。
- 3) 点样 将蛋白样点入点样孔，设置稳压状态电压 80V 电泳 15min，然后 180V 电泳约 50min，直到溴酚兰到达底部。
- 4) 染色 拆开玻璃板，剥离凝胶，并放入考马斯亮蓝染色液中染色 0.5 h。
- 5) 脱色 将染色后的凝胶转入脱色液中脱色 3 h，期间换脱色液 1-2 次。

3.2.2.3 Western blotting

A) 转膜

参照 Towbin 等(1979)的方法。

- 1) 按 3.2.2.2 电泳结束后取下凝胶于 CAPS 缓冲液中平衡 15 s。
- 2) ddH₂O 冲洗电转仪的正负电极。
- 3) 取 2 张转膜专用滤纸（滤纸稍大于凝胶大小）于 CAPS 缓冲液中浸泡，作为正负极滤纸。
- 4) 合适大小的 PVDF 膜于甲醇中漂洗 20 s，以使膜活化，转到 CAPS 缓冲液中平衡 15 s。
- 5) 将正极滤纸平摆于电转仪正极的适当位置，用干净的玻璃棒除去气泡。
- 6) PVDF 膜置于滤纸上合适的位置，用干净的玻璃棒除去气泡。
- 7) 胶置于 PVDF 膜上合适的位置，用干净的玻璃棒除去气泡。
- 8) 将负极滤纸平摆于胶上，同以上方法除去气泡（防止电流不均匀，影响转膜的结果）。
- 9) 启动电转仪，20 V，1 h。
- 10) 取下 PVDF 膜，于通风橱中凉干。

B) Western Blotting

- 1) 将凉干的 PVDF 膜置于成有封闭液的培养皿中，封闭液的用量以覆盖 PVDF 膜为宜，37 $^{\circ}$ C 孵育 1~2h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜。
- 2) 用 TBS-T 缓冲液洗膜 3~5 次，每次 5 min，洗膜时不断摇动培养皿，使之完全清洗干净。
- 3) 将清洗后的膜转入含有兔抗 TMV 的血清（含量为 0.1%）的封闭液的培养皿中，37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜。
- 4) 洗涤，操作过程同 2。
- 5) 洗毕，将膜转入含有碱性磷酸酶标记的羊抗兔血清（0.05%）的 TBS-T 缓冲液的培养皿中，37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜。
- 6) 洗涤，操作过程同 2。
- 7) 将膜转入含有 AP-IgG 底物（1%）的底物缓冲液中。
- 8) 待膜上条带显示清晰的蓝紫色时，将膜转入蒸馏水中，使之终止反应。晾干。

3.2.2.4 包涵体的纯化、变性与复性

A) 包涵体的获得

参照 Sheng Yuan 等(2001)的方法。

- 1) 诱导表达100ml菌液后,将菌液8,000 rpm离心10min, 弃上清。
- 2) 用等体积20 mmol/L Tris-HCl,pH7.5缓冲液悬浮菌体, 8,000 rpm离心10 min, 弃上清。
- 3) 重复步骤(2)一次。
- 4) 用10 ml 20 mmol/L Tris-HCl,pH7.5缓冲液悬浮沉淀。
- 5) 超声波裂解菌体细胞, 40%振幅, 处理9 sec, 间隔9 sec, 共处理15 min。
- 6) 12,000 rpm离心10 min, 分别收集上清和沉淀, 沉淀用20 mmol/L Tris-HCl,pH7.5缓冲液重悬。沉淀为包涵体粗提物。

B) 包涵体的纯化与变性

- 1) 将以上制备的包涵体粗提物用20 mmol/L Tris-HCl,pH7.5缓冲液洗涤, 12,000 rpm离心10 min, 弃上清。
- 2) 沉淀用等体积3 mol/L 尿素悬浮, 洗涤, 12,000 rpm离心10 min, 弃上清。
- 3) 沉淀用等体积20 mmol/L Tris-HCl,pH7.5, 1 % Triton X-100缓冲液悬浮, 洗涤, 12,000 rpm离心10 min, 弃上清。
- 4) 沉淀用等体积20 mmol/L Tris-HCl,pH7.5缓冲液悬浮, 洗涤, 12,000 rpm离心10 min, 弃上清。
- 5) 最后所得沉淀即为纯化后的包涵体,该包涵体用3ml 8 mol/L 尿素悬浮, 室温20 min 即可完全溶解得变性包涵。

C) 包涵体纯度的检验

采用SDS-PAGE 电泳,常规考马斯亮蓝R-250 染色,凝胶光密度扫描,确定包涵体中XBL-AH的相对含量。

D) 包涵体的复性

采用透析法进行包涵体复性,对20 mmol/L Tris-HCl,pH7.5缓冲液透析,每次透析体积为150倍, 4 磁力搅拌, 每隔2.5-3 h 换液1次, 共4次。

3.2.2.5 蛋白含量测定

参照Bradford (1976) 的方法。

- 1) 在试管中加入测试样品 0.2 ml。
- 2) 补加无离子水 1ml, 100 水浴 10min
- 3) 加入 5ml 染料溶液, 混匀
- 4) 室温放置 5 min, 测定 595nm 波长下的吸光值
- 5) 用牛血清白蛋白溶液作标准曲线, 相应求得其蛋白浓度。
- 6) 染料溶液的配制: 称取考马斯亮兰 G-250 0.1g 溶于 95%乙醇 50ml 中, 在加 85%的浓磷酸 100ml, 用水稀释至 1000ml, 备用。

3.2.2.6 氨苄青霉素水解活性测定

参照 Samuni (1975)的方法, 通过紫外分光光度计法测定表达复性的 XBL-AH 水解氨苄青霉素的活性。在 20 mmol/L Tris-HCl, pH7.5 缓冲液中溶解氨苄青霉素至浓度 1 mg/ml, 加入 3.2.2.4

制备的包涵体复性产物, 25℃下温浴 2h, 通过 OD₂₃₅ 检测底物的水解。酶活力单位定义: 将 10min 内水解 1μmol 氨苄西林所需的酶量定义为一个单位 (U)。

3.2.2.7 诱导表达XBL-AH的蛋白纯化

运用AKTA系统 (Amersham) 对经过3.2.2.4变性复性的诱导表达产物进行纯化。将复性透析产物溶解于上样缓冲液 (0.5M NaCl, 20mM 磷酸钠盐, pH7.5) 中, 过亲和柱HiTrap Chelating (Amersham) 1ml, 选用Ni²⁺ 纯化带有 (His)₆的XBL-AH多肽。5ml的双蒸水洗柱, 再用0.5ml的0.1M NiSO₄溶液过柱, 接着用5ml的双蒸水洗柱。用开始缓冲液 (0.5M NaCl, 20mM 磷酸钠盐, pH7.5) 洗柱, 取1ml样品上样, 再用洗脱缓冲液 (0.5M NaCl, 0.5M 咪唑, 20mM 磷酸钠盐, pH7.5) 按照20%、40%、100%进行梯度洗脱, 流速1ml/min, 收集洗脱峰。

3.2.2.8 ELISA检测

- 1) 将 3.2.2.7 纯化的 XBL-AH 诱导表达产物与包被液(50 mM Na₂CO₃-NaHCO₃, pH9.6) 按 1 : 1 加入混合, 取 250μl/孔 4 包被过夜
- 2) PBS-T 缓冲液 (10 mM 磷酸盐-NaCl 缓冲液, 0.05% Tween-20) 3 次, 1.5min/次, 250μl/孔
- 3) 2%BSA (PBS-T 稀释), 250μl/孔, 37℃ 湿盒 1h 封闭
- 4) PBS-T 3 次, 1.5min/次, 250μl/孔
- 5) 加入 1500× His 抗体 (用含 5%脱脂牛奶 PBS-T 稀释), 100μl/孔, 37℃ 湿盒 2h 封闭
- 6) PBS-T 4 次, 5min/次, 250μl/孔
- 7) 加入羊抗鼠 1500× 抗体 (用含 10%牛血清 PBS-T 稀释), 100μl/孔, 37℃ 湿盒 1h 封闭
- 8) PBS-T 4 次, 5min/次, 250μl/孔
- 9) 加 150μl 底物显色液(10 mM 二乙醇胺, 0.5 mM MgCl₂, 1 mg/ml P-NPP, pH 9.5), 37℃ 湿盒 30min 封闭
- 10) 取出后加入 100μl 0.1M NaOH 终止反应, 测吸光值

3.2.3 结果与分析

3.2.3.1 *xbl-ah*基因编码氨基酸的结构预测

从上节3.1克隆的*xbl*基因片段中选取498bp的序列, 命名为*xbl-ah*基因片段。利用DNAMAN 推测编码肽段XBL-AH的氨基酸序列, 并在互联网上进行二级结构预测如图3-9。

```

1      DEI LSQSQI DTNI AVTONHSTATHLAYMTYTS GTTGHPKGMVEHTAMI GRLYGWDVAFG
-----EEEEEE-----HHHEEEEE-----EEHHHHHEEE-----HH-
60     LFQKPPTI LQAGLAVDI FLGDI VKSLTTGRLVI CRKSDLI TTDVLYQLI EQQHVTFGD
-----HHHHHHHHEEEH---HEEH-H---EEEE-----EH-HHHHHHHHHH-----
120    FVPVILRNLLDYAEQNKVQLNSLRTI LVGSEAWYGRDLSRLQKRI H
--HHHHHHHHHHHHH-HHHH--HEEEEE-----HH--HHHHHHH---
```

注: H = helix, E = strand, - = no prediction

图3-9 XBL-AH肽段的氨基酸序列及二级结构预测

Fig 3-9 Sequence of putative peptide XBL-AH and secondary structure prediction

利用在线分子生物学软件 ProtParam 预测该编码肽段的物理化学性质。其理论分子量为 18545.3，等电点 pI 大约 6.64，酸性氨基酸残基总数 15，碱性氨基酸残基总数 14，预测半衰期大于 10 h。利用 TMHMM Server v. 2.0 和 ISREC-Server 提供的 TMpred - Prediction of Transmembrane Regions and Orientation 跨膜结构分析软件进行预测，结果显示 XBL-AH 肽段不具有跨膜结构域，因此可以推断 XBL-AH 肽段无有意义跨膜结构存在（图 3-10，图 3-11）。

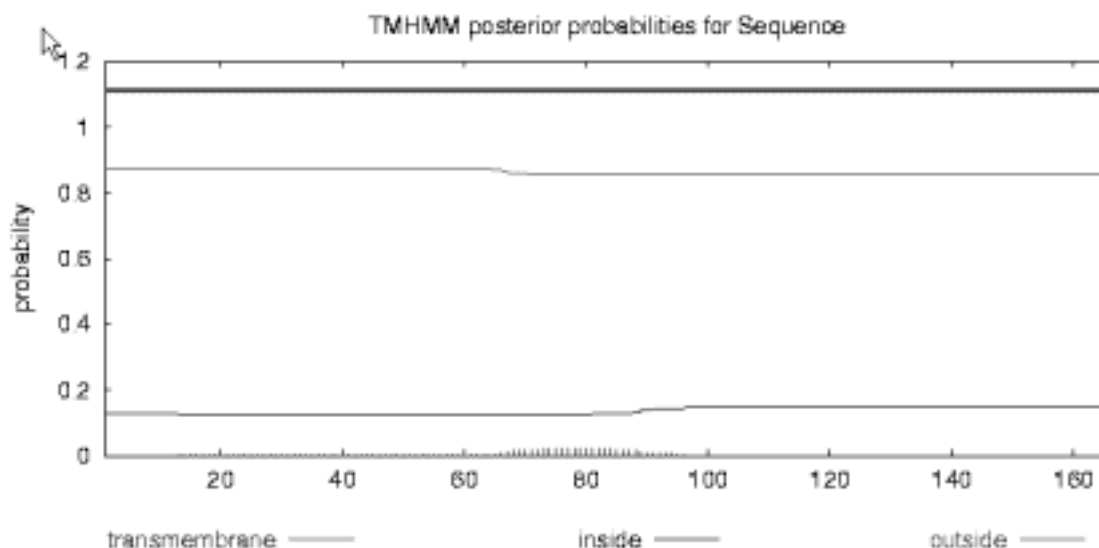


图3-10 嗜线虫致病杆菌北京变种I型菌株XBL-AH肽段的跨膜结构预测（TMHMM）

Fig 3-10 TMHMM transmembrane prediction of XBL-AH peptide of Form I of *X. nematophila* var. *pekingensis*

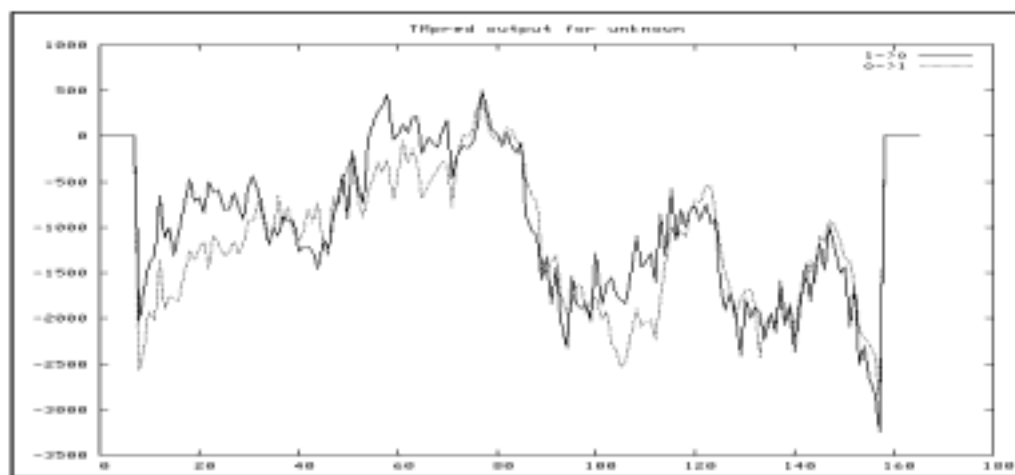


图3-11 嗜线虫致病杆菌北京变种I型菌株XBL-AH肽段的跨膜结构预测（TMpred）

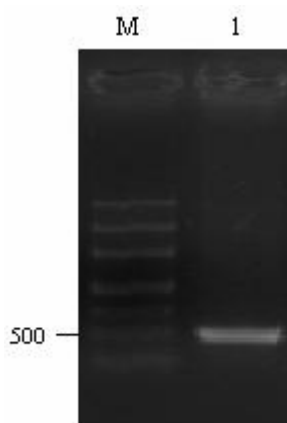
Fig 3-11 TMpred transmembrane prediction of XBL-AH peptide of Form I of *X. nematophila* var. *pekingensis*

利用 expasy 提供的 ScanProsite results viewer 进行蛋白质的模体位置分析,结果表明 XBL-AH 肽段第 28-39 氨基酸推测是 AMP 结合结构域（Putative AMP-binding domain signature）。AMP 结合结构域的特点是：许多原核生物和真核生物酶类都是在 ATP 存在的情况下通过 AMP 与底物结合而发挥作用。例如原核生物中已知与毒素或抗生素相关的酶类包括：短短小芽孢杆菌（*Bacillus brevis*）的短杆菌肽 S 合成酶 I，催化环状抗生素短杆菌肽 S 生物合成第一步，使苯基丙氨酸发生依赖 ATP 的外消旋化作用；短短小芽孢杆菌的短杆菌肽 S 合成酶 II，具有多功能的蛋白质，使脯

氨酸、缬氨酸、鸟氨酸和亮氨酸被激活并发生聚合作用；以及枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 的环肽抗生素表面活性素(surfactin)合成酶亚基 1, 2 和 3。分析结果同时显示 XBL-AH 肽段第 137-152 氨基酸是磷酸泛酰巯基乙胺附着位点 (Phosphopantetheine attachment site), 磷酸泛酰巯基乙胺是一些多酶复合物的酰基载体蛋白 (ACP) 的辅基, 与抗生素相关的酶类相关, 例如: 链霉菌的聚酮类抗生素合成酶多酶系统、青霉菌的多功能 6-甲基水杨酸合成酶、短短小杆菌的短杆菌肽 S 合成酶 I 短杆菌酪肽合成酶 I、许多真菌催化青霉素和头孢菌素生物合成第一步的 ACV 合成酶、以及枯草芽孢杆菌的环肽抗生素表面活性素(surfactin)合成酶亚基 1, 2 和 3。所以可以推测本研究选定表达的 XBL-AH 肽段与抗生素合成或者抗性具有一定的联系。

3.2.3.2 *xbl-ah*基因的PCR扩增

PCR 扩增 *xbl-ah* 基因, 退火温度 55 , 得到 498bp 的基因片段(图 3-12), 测序验证序列完全正确。



M: Marker 1: PCR product of *xbl-ah* gene

图3-12 嗜线虫致病杆菌北京变种I型菌中*xbl-ah*基因的扩增

Fig 3-12 PCR amplification of *xbl-ah* gene from Form I of *X. nematophila* var. *pekingensis*

3.2.3.3 携带北京变种*xbl-ah*基因的质粒pET28AH的构建

本实验利用 pET28a(+)为表达质粒载体, 构建了含嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株 *xbl-ah* 基因的重组质粒 pET28AH, 并将它转化到大肠杆菌 (*E. coli*) BL21(DE3)菌株中, 研究嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株 XBL-AH 肽段的功能。构建图谱如图 3-13 所示。

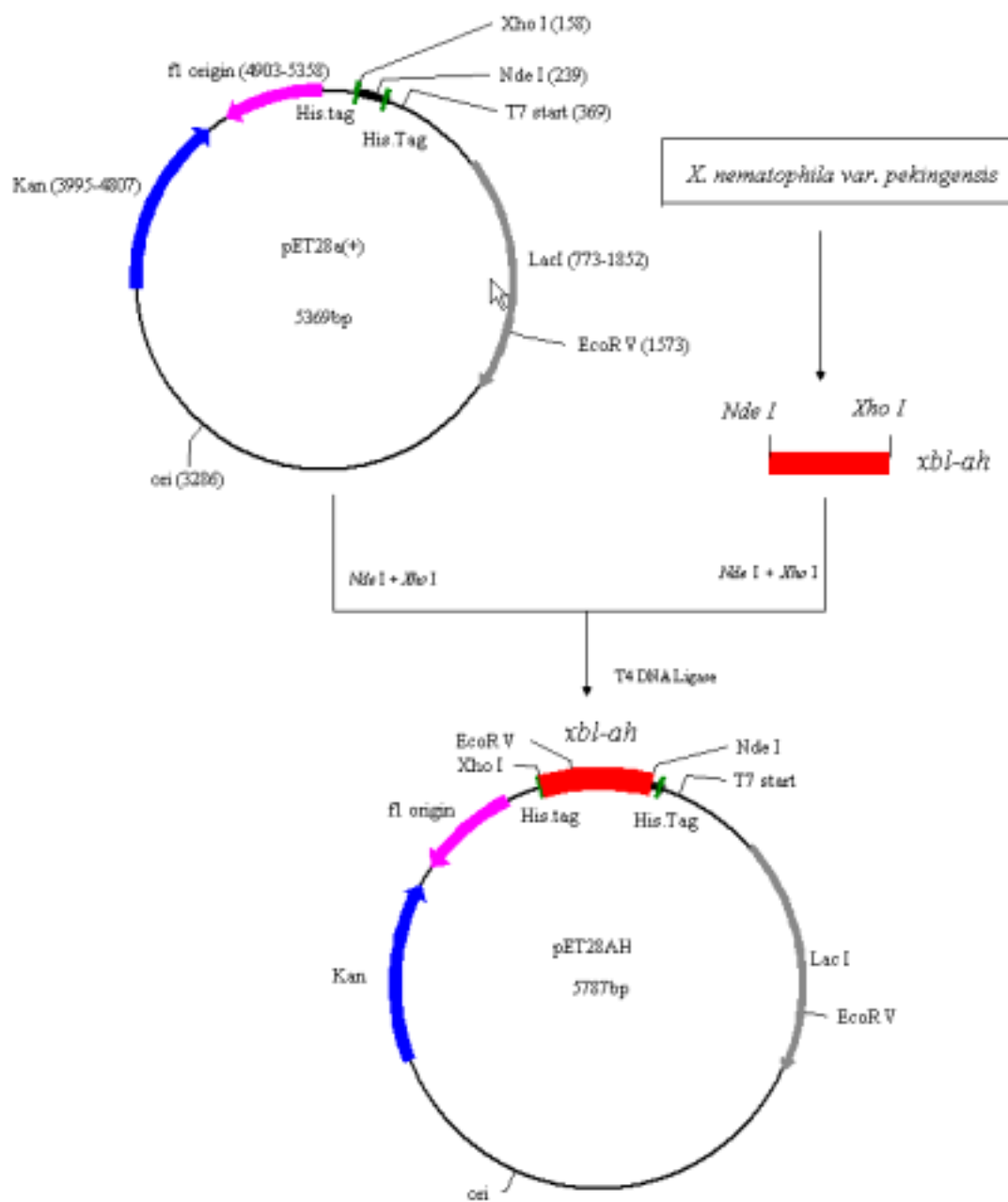
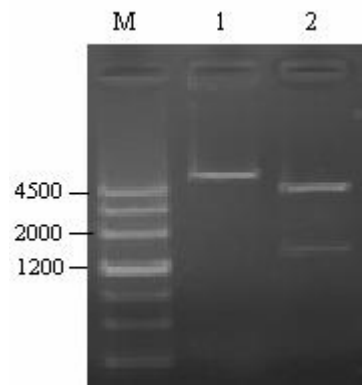


图3-13 pET28AH构建示意图

Fig 3-13 Construction of pET28AH

将PCR扩增得到的 *xbl-ah* 基因片段用 *Nde*I *Xho*I 酶切,回收该片段,与用同样酶切的 pET28a(+) 并回收的表达载体连接,转化 *E. coli*,在含有卡那霉素抗性的 LB 平皿上筛选重组子,提取质粒,酶切验证,得到重组质粒 pET28AH。

由于 pET18a(+)第 1537 位碱基以及 *xbl-ah* 基因第 345 位碱基均为 *Eco*RV 的酶切位点,所以使用利用限制性内切酶 *Eco*RV 对重组质粒进行酶切处理,根据消化产物大小可以判断 *xbl-ah* 基因的插入方向是否正确。结果见图 3-14 所示, pET28AH 经 *Eco*RV 消化后得到大小分别为 4107bp 和 1680bp 的两个片段,证明重组质粒构建成功。



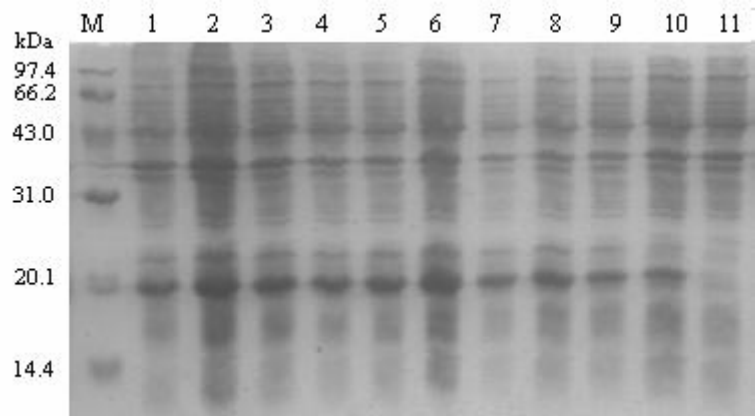
M: Marker 1: pET28AH 2: pET28AH/EcoRV

图3-14 重组表达载体pET28AH的限制性酶切

Fig 3-14 Restriction digestion of recombined vector pET28AH

3.2.3.4 重组表达载体pET28AH的诱导表达

将 pET28AH 转化 *E. coli* BL21 (DE3), 首先在 37 温度下 , 用浓度 1.0 mM IPTG 诱导表达 , 按不同诱导时间取样 , SDS-PAGE 检测蛋白表达情况。结果如图 3-15 所示 , 0.5 mM IPTG 诱导 1h 即有表达产物出现。*xbl-ah* 表达的蛋白的相对分子量约为 20 kDa, 略高于理论推算值 , 原因是由于表达蛋白带有部分载体序列 (His-Tag)。

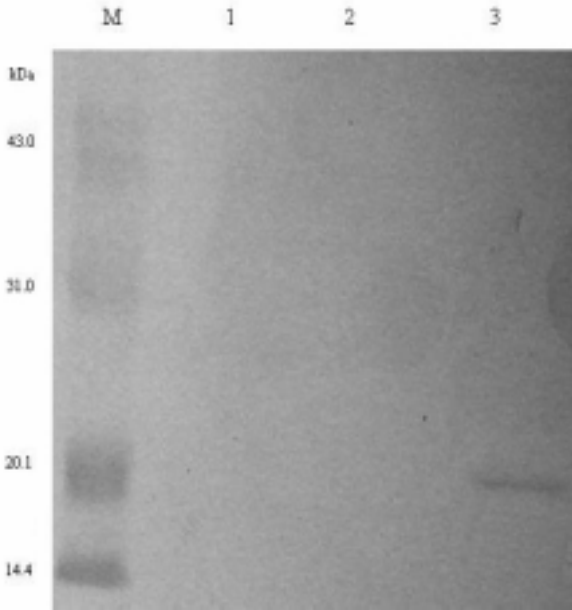


M: Marker 1: 1h 2: 2h 3: 3h 4: 4h 5: 5h 6: 6h 7: 8h
8: 10h 9: 12h 10: 24h 11: 24h induction for empty vector

图3-15 重组表达载体pET28AH的诱导表达

Fig 3-15 Inducible expression of pET28AH in *E. coli*

Western 杂交表明，表达的蛋白确实含有 His 标签（图 3-16）

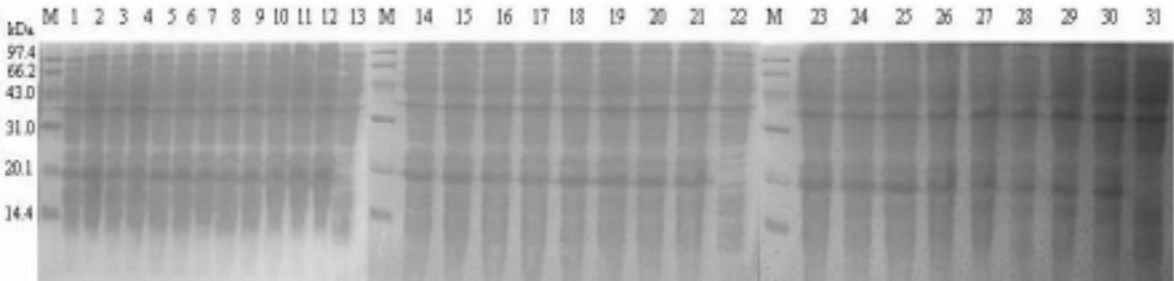


M: Marker 1: Empty vector with IPTG 2: pET28AH without IPTG 3: pET28AH with IPTG

图3-16 XBL-AH表达产物的Western杂交

Fig 3-16 Western blotting of expressed XBL-AH product

本实验尝试不同 IPTG 浓度 (0.1 mM、0.5 mM、0.8 mM 和 1.0 mM) 结合不同培养时间 (1h、2 h、3 h、4 h、5 h 和 6 h) 对 XBL-AH 进行诱导，结果表明，均有目的蛋白出现（图 3-17）。所以以下均以 2 h 作为 IPTG 诱导时间进行实验。



1: 0.1mM IPTG, 1h 2: 0.5 mM IPTG, 1h 3: 0.8 mM IPTG, 1h 4: 1.0 mM IPTG, 1h
5: 0.1mM IPTG, 2h 6: 0.5 mM IPTG, 2h 7: 0.8 mM IPTG, 2h 8: 1.0 mM IPTG, 2h
9: 0.1mM IPTG, 3h 10: 0.5 mM IPTG, 3h 11: 0.8 mM IPTG, 3h 12: 1.0 mM IPTG, 3h
14: 0.1mM IPTG, 4h 15: 0.5 mM IPTG, 4h 16: 0.8 mM IPTG, 4h 17: 1.0 mM IPTG, 4h
18: 0.1mM IPTG, 5h 19: 0.5 mM IPTG, 5h 20: 0.8 mM IPTG, 5h 21: 1.0 mM IPTG, 5h
23: 0.1mM IPTG, 6h 24: 0.5 mM IPTG, 6h 25: 0.8 mM IPTG, 6h 26: 1.0 mM IPTG, 6h
27: 0.1mM IPTG, 6h 28: 0.5 mM IPTG, 6h 29: 0.8 mM IPTG, 6h 30: 1.0 mM IPTG, 6h

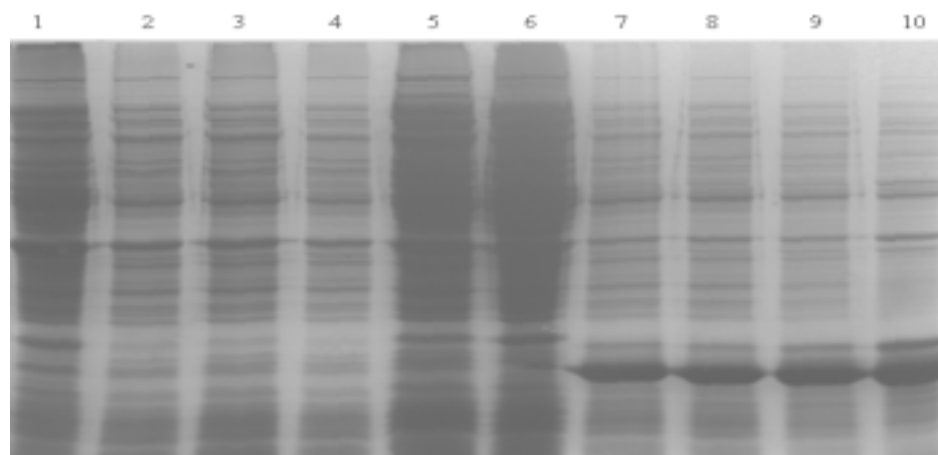
M: Marker 13, 22, 31: 6h induction for empty vector at IPTG concentration of 0.1 mM, 0.5 mM, and 0.8 mM

图3-17 不同浓度IPTG对XBL-AH产物的诱导表达

Fig 3-17 Inducible expression of XBL-AH product with different concentration of IPTG

3.2.3.5 XBL-AH包涵体的鉴定

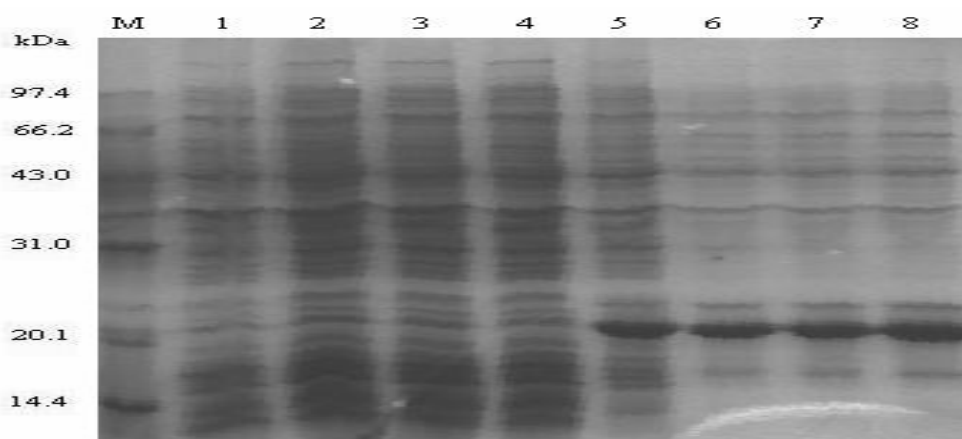
重组蛋白在宿主系统中高水平表达时,由于表达太快,缺乏某些蛋白质折叠过程中需要的酶或辅助因子,或环境不适等等原因,常常无法形成正确的次级键,因而常常会形成包涵体。通常采用降低 IPTG 诱导浓度、降低表达温度、以及减少缩短表达时间等方法可以减少包涵体的产生,使表达产物能够直接分泌到胞外或者细胞周质中。本实验对不同 IPTG 浓度 (0.1 mM、0.5 mM、0.8 mM 和 1.0 mM) 诱导,结果表明,该蛋白均以包涵体的形式出现。使用 25、28、30 和 37 等不同温度诱导表达,超声波破碎菌体,发现均在菌体沉淀中有目的条带出现,而菌体上清中则无任何可见的诱导表达产物 (图 3-18)。甚至在温度为 20 的条件下,XBL-AH 仍然以包涵体的形成表达出现 (图 3-19)。



1: Empty vector, supernatant 2: 25 °C, supernatant 3: 28 °C, supernatant 4: 30 °C, supernatant
5: 37 °C, supernatant 6: Empty vector, sedimentation 7: 25 °C, sedimentation 8: 28 °C, sedimentation
9: 30 °C, sedimentation 10: 37 °C, sedimentation

图3-18 不同温度下XBL-AH包涵体的诱导表达

Fig 3-18 Inducible expression of XBL-AH inclusion body with different temperatures



M: Marker 1: 2h, supernatant 2: 4h, supernatant 3: 6h, supernatant 4: 8h, supernatant
5: 2h, sedimentation 6: 4h, sedimentation 7: 6h, sedimentation 8: 8h, sedimentation

图3-19 20 °C 温度下XBL-AH包涵体的诱导表达

Fig 3-19 Inducible expression of XBL-AH inclusion body at temperature 20 °C

3.2.3.6 XBL-AH包涵体的变性与复性

将表达了 XBL-AH 产物的大肠杆菌进行超声波破碎,将包涵体粗提物用 20 mmol/L Tris-HCl , pH7.5 缓冲液洗涤,以除去包涵体上粘附的杂质,如膜蛋白或核酸。然后用低浓度变性剂 3M 尿素将包涵体进行处理,再用温和去垢剂 Triton X-100 洗涤去除膜碎片和膜蛋白。采用 6M 尿素使包涵体变性,然后用 20 mmol/L Tris-HCl , pH7.5 缓冲液透析,得到的蛋白电泳如图 3-20。凝胶成像系统分析表明,目的蛋白占总蛋白的比例由纯化前的 9.0% 上升至纯化复性后的 54.1%。

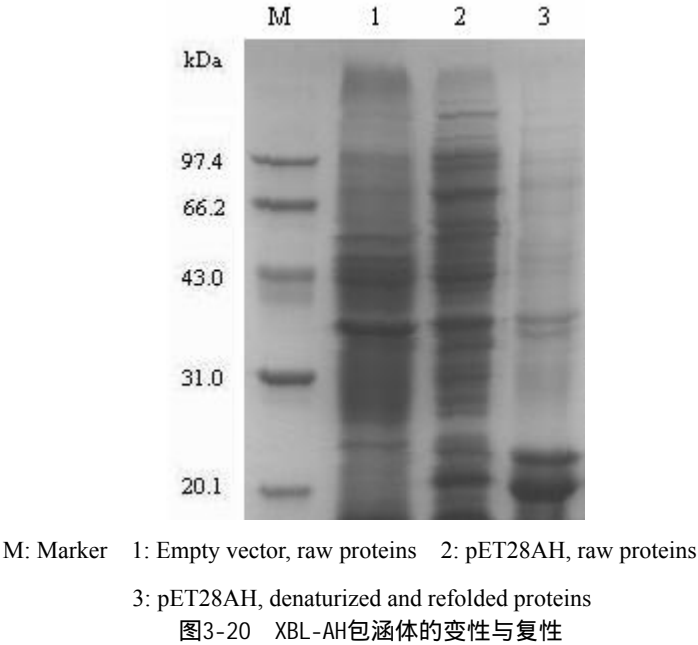


Fig 3-20 Denaturation and re-fold of XBL-AH inclusion body

3.2.3.7 XBL-AH表达产物的氨苄青霉素水解活性

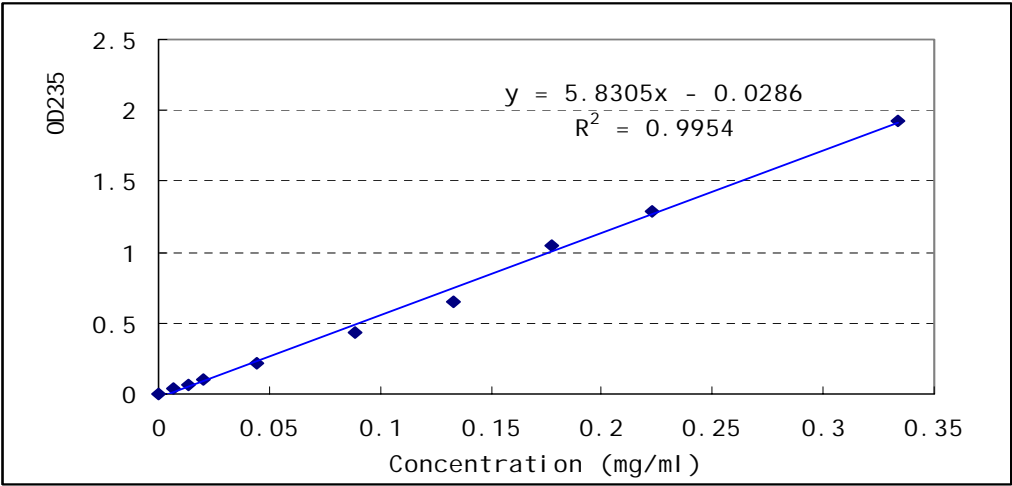


图3-21 氨苄青霉素OD₂₃₅吸收的标准曲线

Fig 3-21 Standard curve of OD₂₃₅ absorption of ampicillin

如图 3-21 所示,氨苄青霉素的 OD₂₃₅ 吸收值与其浓度成线性正相关。本研究以氨苄青霉素为底物,以纯化复性的 XBL-AH 产物为水解酶提取液,测定了 XBL-AH 在大肠杆菌中异源表达后的生物活性。由图 3-22 可以看出, XBL-AH 表达产物的氨苄青霉素水解率为 25.3%,而空载体

对照的氨苄青霉素水解率为 10.8%，与自然水解率（7.5%）相差不大，这证明嗜线虫致病杆菌北京变种 *xbl-ah* 基因表达产物具有氨苄青霉素水解酶的活性。

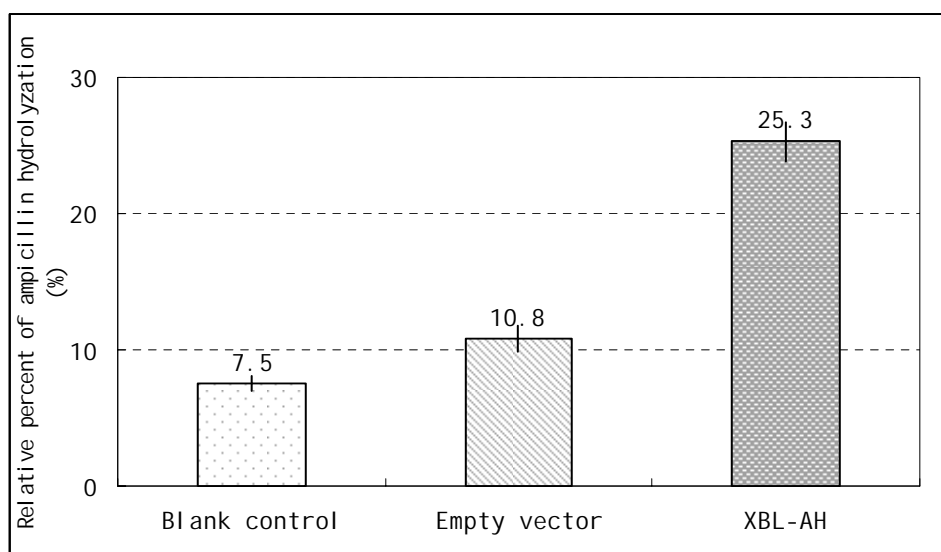


图3-22 XBL-AH表达产物的氨苄青霉素水解活性

Fig 3-22 Ampicillin-hydrolyzing activity of expressed XBL-AH product

3.2.3.8 XBL-AH表达产物的进一步纯化

将 XBL-AH 纯化复性产物用 AKTA 系统进行纯化，由于表达产物含有 (His)₆ 的标签，所以可以结合在螯合有 Ni²⁺ 的亲亲和层析柱上。然后用含有 500 mM 咪唑的洗脱液以 1 ml/min 的流速按照 20%、40% 和 100% 的顺序进行梯度洗脱。结果表明，用 20% 洗脱液洗脱时，有蛋白峰出现（图 3-23）。使用 ELISA 检测，能够产生酶联免疫信号。这表明当洗脱液中咪唑浓度为 100mM 时，可以将结合在 HiTrap 层析柱的带有 (His)₆ 的 XBL-AH 表达产物纯化出来。

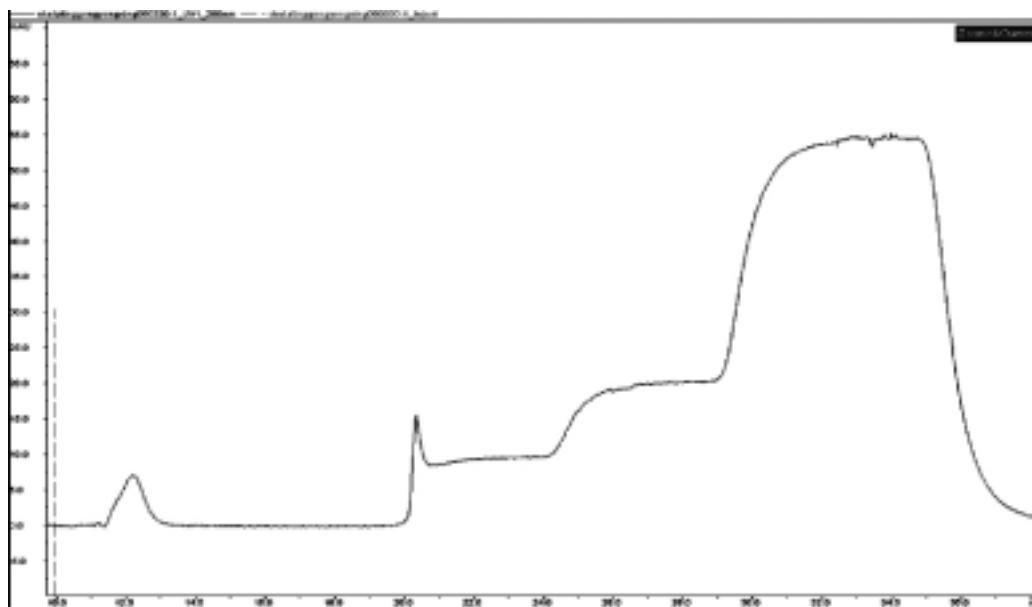


图3-23 XBL-AH表达产物在Hi Trap层析柱中的纯化

Fig 3-23 Purification of XBL-AH induced product with AKTA system

3.2.4 讨论

3.2.4.1 XBL-AH表达产物包涵体的形成

重组蛋白在宿主系统中高水平表达时,由于表达太快,缺乏某些蛋白质折叠过程中需要的酶或辅助因子,或环境不适等等原因,常常无法形成正确的次级键,因而常常会形成包涵体。包涵体的形成有利有弊,优越性在于不仅可获得高表达、高纯度的重组蛋白质,还可避免细胞水解酶对重组蛋白质的破坏,弊端在于大量的蛋白虽然得到表达,但不具有生物学活性。通常采用降低IPTG诱导浓度、降低表达温度、以及减少缩短表达时间等方法可以减少包涵体的产生,使表达产物能够直接分泌到胞外或者细胞周质中,一方面可以简化蛋白纯化操作,另一方面则有利于活性的直接测定。

本实验采用PCR方法先从嗜线虫致病杆菌北京变种I型菌株扩增得到*xbl-ah*序列,然后构建了重组表达载体pET28AH,并在大肠杆菌BL21(DE3)细胞中首次将该肽段表达成功。通过SDS-PAGE电泳发现目的肽段以包涵体的形式存在于细胞中。虽然研究中尝试了不同IPTG诱导浓度,不同的表达温度,以及不同的表达时间,但是都难以得到分泌型的表达产物。

3.2.4.2 XBL-AH包涵体的复性与纯化

包涵体一般要经过细胞破碎、洗涤、溶解和复性等步骤,才能恢复到具有活性的天然状态。本研究中将表达了XBL-AH肽段的大肠杆菌进行超声波破碎,为了除去包涵体上粘附的杂质,如膜蛋白或核酸,将包涵体粗提物用20 mmol/L Tris-HCl, pH7.5 缓冲液洗涤。然后用低浓度变性剂3M 尿素将包涵体进行处理,再用温和去垢剂Triton X-100 洗涤去除膜碎片和膜蛋白。包涵体的溶解一般用强的变性剂如尿素(6-8M)、盐酸胍(6M)、强碱等通过离子间的相互作用,打断包涵体蛋白质分子内和分子间的各种化学键,使多肽伸展。由于包涵体中的重组蛋白缺乏生物学活性,加上剧烈的处理条件,使蛋白的高级结构破坏,因此重组蛋白的复性特别必要,可以通过缓慢去除变性剂使目标蛋白从变性的完全伸展状态恢复到正常的折叠结构。本研究运用透析复性的方法,通过逐渐降低外透液浓度来去除变性剂,从而得到具有生理活性的目标产物。

本实验选用了带融合标签的pET 28a(+)载体。pET28a(+)是T7启动子控制下的高效融合表达载体,可使外源蛋白末端加上6个连续的组氨酸残基亲和臂(His)₆,这种序列标签为蛋白质的亲和纯化以及免疫检测提供了方便。本研究用Western杂交证实表达产物具有(His)₆序列,继续对包涵体复性产物用AKTA系统进行亲和层析,在用含有咪唑的洗脱液进行梯度洗脱时,发现100mM的咪唑可以制备得到XBL-AH的纯化产物,并且用ELISA进行了验证。

3.2.4.3 抗生素相关基因片段*xbl-ah*的意义

本实验首次成功地将嗜线虫致病杆菌北京变种XBL-AH肽段在大肠杆菌中进行异源表达,并且发现XBL-AH包涵体经复性后呈现一定的氨苄青霉素水解活性。抗生素相关基因片段*xbl-ah*的功能发现具有重要的意义:首先,无论是在嗜线虫致病杆菌北京变种,还是在致病杆菌属,甚至在昆虫病原线虫共生细菌中,都是在继外膜蛋白基因、菌毛蛋白基因、共生相关基因和沙虫毒素蛋白基因之后报道的另一种类的功能基因;其次,抗生素相关基因在昆虫病原线虫共生细菌中的功能鉴定,有可能使人们对共生细菌的兴趣从传统的农业研究很快扩展到医药研究,这势必会加速对该细菌的深入了解。

β -内酰胺酶可以使 β -内酰胺环变成开放的环(β -内酰胺类药物失活), 因此赋予 β -内酰胺酶产生微生物对多种青霉素、头孢菌素和单环 β 内酰胺类具有抗性。在革兰氏阳性菌中, β -内酰胺酶作为胞外酶被分泌到细胞膜外环境中。在革兰氏阴性菌中, 它们留在细胞质周间隙, 在那里, 抗生素在到达其受体位点前就被它们攻击(Joumana & George, 2003; Schito, 2006)。本研究中 XBL-AH 肽段的氨苄青霉素水解活性与 β -内酰胺酶的功能具有相似之处, 均能破坏氨苄青霉素的活性基团, 所以 XBL-AH 肽段有可能是嗜线虫致病杆菌北京变种 β -内酰胺酶结构域的活性部位。具体的作用机制尚待进一步研究。

3.3 北京变种 *xbl-ah* 基因的分布

能够产生细胞毒性分子或者抗生素活性分子的微生物,必须具备相应的途径以抵抗它们产生的毒性物质,否则它们在产生抗生素时会发生自杀作用。这个事实使人们提出,产生抗生素的微生物可能是大多抗生素抗性基因的来源(Benveniste & Davies, 1973)。从生化相似性和核酸序列关系研究中有确切的证据支持这种论点。

β -内酰胺酶的合成可以是染色体依赖的(结构性),比如铜绿假单胞菌;也可以是质粒介导的(诱导性),比如嗜水气单胞菌和金黄色葡萄球菌。质粒是引起细菌耐药性传播的主要原因,因为它们既可以通过接合方式在革兰氏阴性菌之间互相转移 β -内酰胺酶基因,又可以通过转导噬菌体在革兰氏阳性菌之间互相传递该基因。特别是当医院没有采取适当的控制感染的措施时,正是由于这种可转移性,导致许多耐药菌感染的暴发。所以传统上人们认为微生物的抗生素抗性基因的产生是由于抗生素药物在农业或者临床上的使用及滥用引起的。近年来越来越多的学者对此观点持怀疑态度。

本论文已获得的研究结果表明,嗜线虫致病杆菌北京变种的 XBL-AH 肽段表达产物具有氨苄青霉素水解活性,即具有一定的抗生素抗性功能。揭示编码该肽段的 *xbl-ah* 基因片段的起源和进化将有利于加深对此菌抗生素抗性的进一步了解。本实验主要对 *xbl-ah* 基因在嗜线虫致病杆菌北京变种菌株遗传物质 DNA 的分布来进行研究。通过提取染色体 DNA 和质粒 DNA,利用 PCR 扩增方法来判断 *xbl-ah* 基因片段的定位。同时,结合嗜线虫致病杆菌北京变种质粒的抗生素抗性,对抗生素抗性基因的起源和进化进行讨论。

3.3.1 实验材料

3.3.1.1 材料

嗜线虫致病杆菌北京变种(*X. nematophila* var. *pekingensis*) I 型菌株野生型由本实验室分离、保存;大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α [supE55 Δ lacU169(ψ 80lacZ Δ M15)hsdR17 recA endA Nxr]感受态细胞购自博大泰克生物工程公司。

3.3.1.2 常用溶液

溶液 :

葡萄糖	50 mol/L
EDTA (pH8.0)	10 mol/L
Tris-HCl (pH8.0)	25 mol/L

溶液 : (现用现配)

SDS	1% (w/v)
NaOH	0.2 mol/L
2%SDS 和 0.4 mol/L NaOH 等体积混合	

溶液 :

KAc	5 mol/L
冰乙酸	11.5 ml
加蒸馏水定容至 100 ml	
CTAB/NaCl 溶液:	
NaCl	4.1 g
SDS	10 g
加蒸馏水定容至 100 ml	

3.3.1.3 试剂

Taq DNA 聚合酶、dNTP 为 TaKaRa 产品；化学试剂（分析纯）购于北京化学试剂公司。

3.3.2 实验方法

3.3.2.1 北京变种I型菌株基因组DNA的提取

- 1) 从活化的嗜线虫致病杆菌北京变种菌株的 NBTA 平板上挑取单菌落接种到含 150ml LB 培养基中，28℃，180 rpm 振荡培养过夜，OD₆₀₀ 值达到 0.6 左右。置于冰上冷却。
- 2) 将 100 ml 培养液转移至离心管中，12,000 rpm 离心 5 min，弃上清。
- 3) 加入 9.5ml TE 悬浮沉淀，并加 0.5ml 10% SDS, 50μl 20mg/ml(或 1mg 干粉)蛋白酶 K，混匀，37℃ 保温 1 小时。
- 4) 加 1.5ml 5mol/L NaCl，混匀。
- 5) 加入 1.5ml CTAB/NaCl 溶液，混匀，65℃ 保温 20 分钟。
- 6) 用等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提，12,000 rpm 离心 10 分钟，将上清液移至干净离心管。
- 7) 用等体积氯仿:异戊醇(24:1)抽提，12,000 rpm 离心 10 分钟，取上清液移至干净管中。
- 8) 加入 0.6-1 倍体积异丙醇，-20℃ 静置 30 min。
- 9) 12,000 rpm 离心 10 min，弃上清。
- 10) 将沉淀悬浮于 10 ml 超纯水中。
- 11) 加入 RNase，37℃ 水浴 30 min。
- 12) 加入等体积饱和酚:氯仿:异戊醇（25:24:1），上下颠倒数次混匀。
- 13) 12,000 rpm 离心 10min，吸取上相液体。
- 14) 加入等体积饱和氯仿:异戊醇（24:1），上下颠倒数次混匀。
- 15) 12,000 rpm 离心 10min，吸取上相液体。
- 16) 加入 1/10 体积 3 M NaAc，再加入 2 倍体积预冷的无水乙醇，-20℃ 放置 30min。
- 17) 12,000 rpm 离心 15min，弃上清，用 70%的乙醇洗涤沉淀。
- 18) 自然风干后，加入 1-2 ml TE 或者超纯水溶解 DNA。
- 19) 紫外分光光度计测定 OD₂₃₅、OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀，以判定提取的基因组 DNA 的纯度和浓度。

3.3.2.2 北京变种I型菌株质粒DNA的提取

按照萨姆布鲁克 (2002)碱裂解法操作

- 1) 从活化的北京变种菌株的 NBTA 平板上挑取单菌落接种到含 150ml LB 液体培养基的三角瓶中, 28℃, 180 rpm 振荡培养过夜, OD₆₀₀ 值达到 0.4 - 0.6。置于冰上冷却。
- 2) 将培养液转移至离心管中, 12,000 rpm 离心 5 min。
- 3) 完全倒掉上清, 用 5 ml 溶液 I 悬浮沉淀菌体, 冰上放置 5 min。
- 4) 加入现配的 10 ml 溶液 II, 上下颠倒数次混匀, 冰上放置 5 min。
- 5) 加入 7.5 ml 溶液 III, 上下颠倒数次, 冰上放置 5 min。
- 6) 12,000 rpm 离心 10 min, 将上清转移至另一干净离心管中。
- 7) 加入 0.6-1 倍体积异丙醇, -20℃ 静置 30 min。
- 8) 12,000 rpm 离心 10 min, 弃上清。
- 9) 将沉淀悬浮于 10 ml 超纯水中。
- 10) 加入 RNase, 37℃ 水浴 30 min。
- 11) 加入等体积饱和酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1), 上下颠倒数次混匀。
- 12) 12,000 rpm 离心 10min, 吸取上相液体。
- 13) 加入等体积饱和氯仿/异戊醇 (24:1), 上下颠倒数次混匀。
- 14) 12,000 rpm 离心 10min, 吸取上相液体。
- 15) 加入 1/10 体积 3 M NaAc, 再加入 2 倍体积预冷的无水乙醇, -20℃ 放置 30min。
- 16) 12,000 rpm 离心 15min, 弃上清, 用 70%的乙醇洗涤沉淀。
- 17) 自然风干后, 加入 1-2 ml TE 或者超纯水溶解质粒 DNA。

3.3.2.3 北京变种I型菌株质粒在大肠杆菌中的转化

同 3.1.2.3。

3.3.2.4 抗生素抗性测定

同 2.1.2.1 和 2.1.2.2。

3.3.2.5 北京变种I型菌株基因组和质粒中*xbl-ah*基因的PCR扩增

引物设计、反应程序同 3.2.2.1。

反应体系稍有改动为：

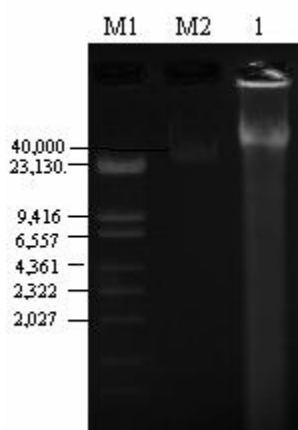
模板 DNA (基因组或质粒 DNA)	1	μl	(100 - 200 ng)
上游引物 (2.5 uM)	1	μl	
下游引物 (2.5 uM)	1	μl	
dNTPs (10 uM)	0.4	μl	
10×Buffer	2	μl	
Taq DNA 聚合酶 (2U/μl)	0.5	μl	
ddH ₂ O	14.1	μl	
总体积	20	μl	

PCR 反应结束后，进行琼脂糖凝胶电泳检测。

3.3.3 结果与分析

3.3.3.1 北京变种I型菌株基因组DNA的提取

提取嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株的基因组，紫外分光光度计测定 $OD_{260}/OD_{280}=1.83$ ， $OD_{230}/OD_{260}=0.45$ ，表明基因组纯度较高，核酸和蛋白污染少；1 %琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 3-24，显示 DNA 质量良好，可用于 PCR 扩增和其他操作。



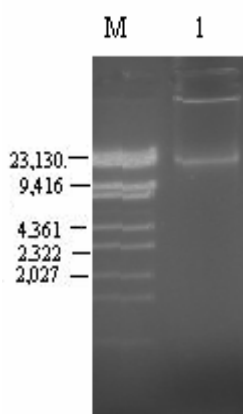
M1: Marker M2: Marker (40 kb) 1: Genome from Form I of *X. nematophila* var. *pekingensis*

图3-24 嗜线虫致病杆菌北京变种基因组DNA的提取

Fig 3-24 Isolation of genome from Form I of *X. nematophila* var. *pekingensis*

3.3.3.2 北京变种I型菌株质粒DNA的提取

运用碱裂解法，对嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株进行质粒提取，结果如图 3-25 所示，在 23 kb 左右的位置发现有质粒条带，将其命名为 pBJ-1。



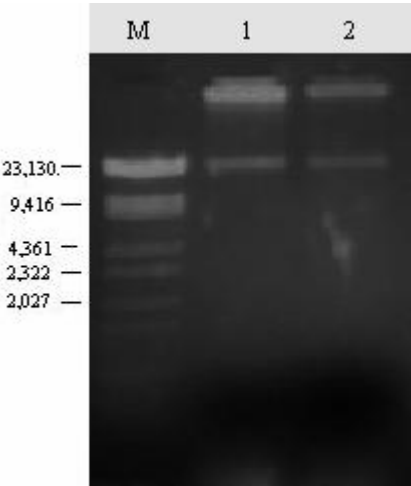
M: Marker 1 Plasmid pBJ-1 from Form I of *X. nematophila* var. *pekingensis*

图3-25 嗜线虫致病杆菌北京变种质粒的提取

Fig 3-25 Isolation of plasmids from Form I of *X. nematophila* var. *pekingensis*

3.3.3.3 质粒pBJ-1在大肠杆菌中的转化

本实验尝试以大肠杆菌 DH5α 为宿主菌，将 pBJ-1 进行转化，结果表明该质粒能在大肠杆菌中转化成功。转化后挑取的克隆用碱裂解法提取的质粒电泳见图 3-26。



M: Marker 1: Control of pBJ-1 2: Transformed pBJ-1 into *E. coli*

图3-26 嗜线虫致病杆菌北京变种质粒pBJ-1的转化

Fig 3-26 Transformation of plasmid pBJ-1 into *E. coli*

3.3.3.4 质粒pBJ-1的抗生素抗性测定

将含有质粒 pBJ-1 的大肠杆菌进行抗生素抗性测定，结果表明转化菌株能在氨苄青霉素（50μg/ml）和链霉素（10μg/ml）的选择培养基中生长，而在卡那霉素和氯霉素中均不能生长。这表明质粒 pBJ-1 可能含有氨苄青霉素抗性基因和链霉素抗性基因（表 3-1）。

表 3-1 质粒 pBJ-1 转化大肠杆菌的抗生素抗性

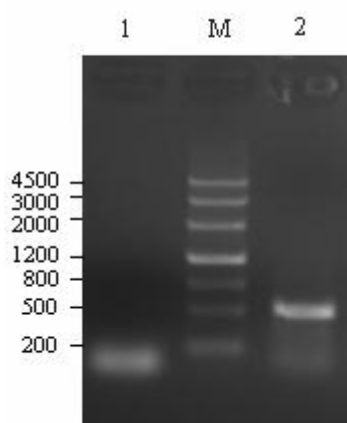
Table 3-1 Antibiotics resistance of pBJ-1- transformed *E. coli*

抗 生 素		菌株生长情况
Antibiotics		Strain growth status
ampicillin	(50 μg/ml)	+
streptomycin	(10 μg/ml)	+
kanamycin	(25 μg/ml)	-
chloramphenicol	(50 μg/ml)	-

注：+ 生长 - 不生长

3.3.3.5 北京变种I型菌株*xbl-ah*基因的定位

为了研究 *xbl-ah* 基因片段是否就是 pBJ-1 质粒氨苄青霉素抗性基因的结构部分，本实验分别以嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株的基因组和质粒为模板，利用 *xbl-ah* 基因的引物，进行 PCR 扩增。结果在菌株的基因组中可以扩增得到目的片段，而在质粒中呈阴性反应（图 3-27）。这表明，*xbl-ah* 基因位于细菌基因组中，而非质粒上，因此可以得知 *xbl-ah* 所在的抗生素相关基因和质粒所具有的抗生素抗性基因分别位于各自独立的基因位点。



M: Marker 1: PCR product from plasmid 2: PCR product from genome

图3-27 嗜线虫致病杆菌北京变种 *xbi-ah* 基因在基因组和质粒DNA中的PCR扩增

Fig 3-27 PCR amplification of *xbi-ah* gene from genome and plasmid DNA of *X. nematophila* var. *pekingensis*

3.3.4 讨论

3.3.4.1 北京变种I型菌质粒pBJ-1的发现

前人的研究表明,由于提取方法的不同,得到的关于致病杆菌质粒存在情况的结果也各异。当用碱裂解法分析致病杆菌菌株染色体外DNA的多样性时,只能检测到分子量小于15 kb的质粒,而大一些的质粒由于易于降解所以不能用这些方法检测出来(Couche et al, 1987)。用各种制备型质粒提取方法得到的结果相似,没有检测到大于40 kb的质粒,尽管Kado and Liu (1981)用该法可以从其他细菌中得到分子量达至150 kb的巨型质粒。Plazinski et al (1985)使用温和的改进方法,在所有被检测的致病杆菌属和发光杆菌属菌株中,除了得到小分子量的质粒而外,还可以检测到一个或者两个巨型质粒。Smigielski and Akhurst (1994)运用类似的方法从嗜线虫致病杆菌A24菌株I型菌和II型菌中,除了制备到3.5、6.5、12.5和17 kb四种小质粒而外,还得到两个巨型质粒,大小分别是71.8 kb和118.5 kb。本研究用碱裂解法提取质粒,从嗜线虫致病杆菌北京变种I型菌株中得到一个大小约为23 kb的质粒pBJ-1。

致病杆菌属不同的菌株与其寄主线虫的共生具有专一性,例如嗜线虫致病杆菌只和小卷蛾斯氏线虫(*S. carpocapsae*)专化共生。本研究进一步将pBJ-1成功地转化到大肠杆菌细胞中,证明质粒pBJ-1除了能够在本身宿主菌嗜线虫致病杆菌北京变种中繁殖而外,还可以在同为肠杆菌科的大肠杆菌中繁殖。质粒存活范围的扩大对于致病杆菌的实际应用具有深远的意义,即有可能利用该细菌本身的质粒作为载体,将嗜线虫致病杆菌北京变种的杀虫抑菌相关基因(包括质粒本身携带的有用基因),转化到其他低毒力的共生细菌细胞中,不但可以提高这些细菌的杀虫抑菌力,也可能增强其寄主线虫的毒力,这在生产上具有极为有用的价值。

3.3.4.2 抗生素抗性的起源与进化

β -内酰胺及其多种同系物(头孢菌素,青霉素等)是使用最广泛的抗生素,但早在1940年就有人预言微生物对 β -内酰胺的抗性,这比青霉素用于临床治疗还要早几年(Abraham & Chain,

1940)。一种新的抗生素的引进使用都伴随着抗性的产生,一般抗生素只要在临床上开始投入使用,那么三年之内就可能产生抗生素抗性菌株(Jaurin et al, 1982; Ehrhardt & Sanders, 1993; Bush et al, 1995; Huowinen et al, 1995; Paterson, 2005)。当抗性基因位于质粒上,则可通过转化、转导或者接合转移等多种机制在不同微生物之间进行水平转移(Mazodier & Davies, 1991; Davies, 1995; Gootz, 2004)。水平基因转移导致基因的快速传播似乎与近年来抗生素抗性微生物的不断产生相对应,这使许多人认为微生物的抗生素抗性的产生是由抗生素药物在农业或者临床上的使用(及滥用)直接引起的。但近年来不断有证据表明有些抗性基因在抗生素开始使用之前就已存在,同时基因位于染色体上,一般只能通过垂直转移在微生物上下代之间传递,这对传统的抗生素抗性基因的起源与进化提出挑战(Barlow & Hall, 2002)。

本实验所进行的与抗生素抗性相关的基因片段 *xbl-ah* 在染色体或者质粒上定位研究,能够对抗生素抗性基因的起源和进化提供进一步的证据。研究结果表明, *xbl-ah* 基因位于细菌染色体 DNA 上,而非质粒 DNA 上。尽管从菌株中提取得到的质粒 pBJ-1 也表现出氨苄青霉素抗性特征,但可以推断质粒的抗性与 *xbl-ah* 基因无直接关系,即 *xbl-ah* 基因与质粒上的氨苄青霉素抗性基因是两个独立的遗传因子,它们在细胞内发挥着各自的功能。*xbl-ah* 基因片段的染色体定位再次证明传统意义认为抗生素抗性源于抗生素应用论点的局限性。同时对抗生素抗性起源的另一观点提供了支持,即在还没有使用磺胺或抗生素以前,在微生物群体中,早已存在有抗药的个体,只是在没有药剂存在的环境下,不表现出抗药现象而已(李季伦等, 1993; Poole, 2004)。

第四章 结论与展望

4.1 结论

本研究对嗜线虫致病杆菌北京变种的质粒转化技术进行了探讨,并对菌株的抗生素相关基因片段进行克隆、功能鉴定和 DNA 定位,得出以下结论:

- 1) 测定了嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌的抗生素抗性。北京变种对氯霉素、新霉素和卡那霉素敏感;对链霉素、氨苄青霉素和青霉素具有一定的抗性。
- 2) 首次研究了外源质粒不同转化方法对嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株生理生化特性的影响,确定了接合转移是适宜菌株遗传操作的最佳方法。
- 3) 利用接合转移的三亲杂交方法,建立了嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株外源质粒转化体系。成功地将质粒 pSZ21 和 pLA2917 转化到北京变种 I 型细胞中,但对菌株的许多代谢途径及性状产生了较大的影响。
- 4) 首次从嗜线虫致病杆菌北京变种中克隆得到抗生素相关基因 *xbl* 基因片段。在 GenBank 提交注册 (Accession No.: DQ631811)。
- 5) 将嗜线虫致病杆菌北京变种中具有氨苄青霉素水解活性的 *xbl-ah* 基因片段实现原核表达、蛋白纯化及生物活性测定。
- 6) 对 *xbl-ah* 基因片段进行定位,明确了 *xbl-ah* 基因位于细菌染色体 DNA 上,而非质粒 DNA 上。*xbl-ah* 基因与质粒 pBJ-1 上的氨苄青霉素抗性基因是两个独立的遗传因子,它们在细胞内发挥着各自的功能。

4.2 创新点

首次采用受体细菌代谢的指标来评价电击转化、化学转化和接合转移三种常见的细菌质粒转化方法,明确了接合转移方法是致病杆菌的最佳转化技术。用接合转移方法在国内首次成功地完成了嗜线虫致病杆菌北京变种遗传转化体系的构建,为该菌的深入基因工程研究奠定了基础。

直接将质粒载体转入嗜线虫致病杆菌北京变种受体细胞,在相对理想状态下分析外源质粒导入对致病杆菌细胞的代谢尤其是抑菌活性的影响,国内外尚无相关报道。

在嗜线虫致病杆菌北京变种菌株克隆得到抗生素相关基因 *xbl* 基因片段,在 GenBank 提交注册 (Accession No.: DQ631811)。将具有氨苄青霉素水解活性的 *xbl-ah* 基因片段实现原核表达并进行了功能鉴定和蛋白纯化研究,并且确定了抗生素抗性基因片段 *xbl-ah* 的染色体定位。

首次在嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株中发现了具有抗生素抗性的质粒 pBJ-1 并将其转化到大肠杆菌细胞中,揭示了抗生素抗性在此菌内由 2 个(或 2 个以上)的遗传因子所控制。

4.3 展望

4.3.1 菌株的抗生素抗性与抑菌活性的相关性

在准备试验中发现,嗜线虫致病杆菌北京变种的 I 型菌株和 II 型菌株对 β -内酰胺类抗生素均具有抗性,而且 I 型菌株比 II 型菌株的耐受程度要高。与之相对应的是, I 型菌株比 II 型菌株的抑菌活性高 10 倍。那么嗜线虫致病杆菌北京变种两型细胞的产抗生素能力差异与抗生素抗性水平差异之间是否具有相关性,其机理值得进一步研究。

4.3.2 转化操作技术在菌株筛选中应用的可行性

本实验在操作过程中发现,运用化学转化和电击转化方法,均可以得到嗜线虫致病杆菌北京变种的卡那霉素抗性菌株,这表明细菌 DNA 中可能存在卡那霉素抗性基因,在野生型菌株中该基因处于沉默状态。一旦受到外界刺激,如本研究中的热激处理和瞬时高压处理,细胞即作出应答反应,打开调控基因开关,使相关的基因开始转录,表达成相应的酶类或者其他蛋白,从而表现出卡那霉素抗性。这说明化学转化和电击转化对嗜线虫致病杆菌北京变种的生物学特性产生了影响,但也给我们以启示,化学转化和电击转化是否也可以作为新的筛选技术,值得进一步探讨。

4.3.3 转座子诱变技术在致病杆菌中的应用

本研究最初曾期望利用自杀性质粒 pSZ21 的 Tn5 转座子构建该菌株的突变体库,然后根据抑菌活性的强弱,筛选出抗生素相关基因被 Tn5 插入失活的无抑菌活性的突变体,或者有可能幸运地得到抑菌活性有所增加的菌株从而找到抗生素合成的调节基因。但是在研究中发现,所有被检测的嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株转化接合子无一例外地呈现出抑菌活性降低的态势,同时降低的程度普遍较高,这为突变体库的筛选带来了难度。进一步研究证明受体菌嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型细胞本身可以表达自杀质粒 pSZ21 复制所需的 π 蛋白,从而使 pSZ21 在转化接合子中以环形质粒的形式不断复制。嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株的 pSZ21 转化接合子发生的生理生化特性和抑菌活性的变化并不一定是由 Tn5 的转座插入引起的。这似乎说明在使用转座子诱变技术筛选致病杆菌突变株时,其性状的突变并不一定完全由转座子的插入失活而引起的,这一现象有待进一步证实。

4.3.4 氨苄青霉素水解活性基因 *xbl-ah* 片段的其他功能

本实验在大肠杆菌中表达的嗜线虫致病杆菌北京变种的 XBL-AH 肽段经 SDS-PAGE 电泳,发现目的肽段均以包涵体的形式存在于细胞中。虽然研究中尝试了不同 IPTG 诱导浓度,不同的表达温度,以及不同的表达时间等各种诱导方法,但是都难以得到分泌型的表达产物。包涵体的形成虽然为蛋白产物的纯化带来了一定的难度,但是也暗示 XBL-AH 表达产物有可能除了具有氨苄青霉素的水解活性而外,还具有其他一些功能,例如对宿主细胞有一定的

毒性。当天然状态的 XBL-AH 产物表达时, 直接对大肠杆菌会产生抑制甚至杀灭作用, 所以包涵体的形成有可能是大肠杆菌为了防止自杀现象而具有的一种主动防御功能。因此, XBL-AH 表达产物的其他功能值得进一步研究。

4.3.5 基因组文库在抗生素相关基因研究中的应用

本研究还完成了嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株基因组粘粒文库的构建, 但由于当时尚无该菌抗生素基因的相关信息, 所以尝试了直接测定抑菌活性的方法进行抗生素相关基因的克隆筛选。前人的研究表明嗜线虫致病杆菌北京变种 I 型菌株的代谢物质对多种细菌和真菌表现出抑菌活性, 即该菌株产生的抗生素不仅对本筛选实验中使用的指示菌枯草芽孢杆菌有抑制作用, 而且对大肠杆菌还同样具有抑菌活性。所以用大肠杆菌构建的粘粒文库可能存在某种风险, 即本来某些克隆的插入片段含有我们需要的抗生素合成基因簇的完整序列, 但是当基因簇完全表达时, 由于表现出来的活性对宿主菌有毒害作用, 使宿主菌不能正常生长或甚至不能存活, 那么我们最期望得到的这些克隆将很有可能在文库中缺失。实验中随机选择 428 个粘粒克隆, 经过 4 轮筛选得到克隆 cos248, 抑菌圈直径稍高于对照, 即仅表现轻微的抑菌活性, 看上去不甚理想, 因为只有含有完整的抗生素合成基因簇的克隆才可能表现出较高的抑菌活性。但鉴于只有含有抗生素合成基因不完全序列的克隆才有可能被筛选出来, 所以可以预测克隆 cos248 虽然不一定是完整的 DNA 序列, 但可能含有抗生素合成的相关基因, 需要以后进一步证实。同时可以借鉴他人研究抗生素基因的经验, 以本研究已经明确的抗生素相关基因片段序列制作探针, 用杂交的方法筛选得到含有抗生素基因簇的克隆, 目的性更强, 成功的把握更大, 值得以后进行探讨。

参考文献

- [1] Abraham E.P., Chain E., An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 1940, 146: 837.
- [2] Akhurst R.J., A.J. Smigielki, J. Mari, et al., Restriction analysis of phase variation in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), entomopathogenic bacteria associated with nematodes. *Syst. Appl. Microbiol.* 1992, 15: 469-473.
- [3] Akhurst R.J., Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families heterorhabditidae and steinernematidae. *Journal of General Microbiology* 1982, 128: 3061-65.
- [4] Akhurst R.J., Boemare N.E., A numerical taxonomic study of the genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) and proposed elevation of the subspecies of *X. nematophilus* to species. *Journal of General Microbiology* 1988, 134: 1835-1845.
- [5] Akhurst R.J., Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacterial symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *Journal of General Microbiology* 1980, 121: 303-309.
- [6] Allen L.N., Hanson S.R., Construction of broad-host-range cosmid cloning vectors: Identification of genes necessary for growth of *Methylobacterium organophilum* on methanol. *Journal of Bacteriology* 1985, 161 (3): 955-962.
- [7] Barlow M., Hall B.G., Origin and evolution of the AmpC β -lactamases of *Citrobacter freundii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002, 46: 1190-1198
- [8] Benveniste R., Davies J., Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 1973, 70(8): 2276-80.
- [9] Bintrim S.B., Mitchell J.C., Larrinua I.M., *Xenorhabdus* to proteins and genes for pest control. Patent: WO 2004067750-A, 12-AUG-2004.
- [10] Boemare N.E. Akurst R.J., Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp.(Enterobacteriaceae). *Journal of General Microbiology* 1988, 134: 751-761.
- [11] Boemare N.E., Boyer-Giglio M.H., Thaler J.O., The phages and bacteriocins of *Xenorhabdus* spp, symbiont of the nematodes *Steinernema* spp.and *Heterorhabditis* spp. *Nematodes and the Biological control of Insect pests*, Australia: CSIRO press, 1994: 137-145.
- [12] Boemare N.E., Interactions between the partners of the entomopathogenic bacterium nematode complexes, *Steinernema-Xenorhabdus* and *Heterorhabditis-Photorhabdus*. *Nematology* 2002, 4(5): 601-603.
- [13] Bowen D., Rocheleau T.A., Blackburn M., et al., Insecticidal Toxins from the Bacterium

- Photorhabdus luminescens*. Science 1998, 280: 2129-2132.
- [14] Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976, 72: 248-54.
- [15] Brillard J., Boyer-Giglio M.H., Boemare N.E., et al., Holin locus characterisation from lysogenic *Xenorhabdus nematophila* and its involvement in *Escherichia coli* SheA haemolytic phenotype. FEMS Microbiol Lett. 2003, 218(1): 107-113.
- [16] Brown S.E., Cao A.T., Dobson P., et al., Txp40, a ubiquitous insecticidal toxin protein from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 2006, 72(2): 1653-62.
- [17] Brown S.E., Cao A.T., Hines E.R., et al., A novel secreted protein toxin from the insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila*. J Biol Chem. 2004, 279(15): 595-601.
- [18] Bruist, M.F., Simon M.J., Phase variation and the Hin protein: in vivo activity measurements, protein overproduction, and purification. Journal of Bacteriology 1984, 159: 71-79.
- [19] Bush K., Jacoby G.A., Medeiros A.A., A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother. 1995, 39(6): 1211-33.
- [20] Chen C., Dunphy G.B., Webster J.M., Antifungal activity of two *Xenorhabdus* species and *Photorhabdus luminescens*, bacteria associated with the nematodes *Steinernema* species and *Heterorhabditis megidis*. Biological Control 1994, 4: 157-162.
- [21] Chen G., Zhang Y., Li J., et al., Chitinase activity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species, bacterial associates of entomopathogenic nematodes. Journal of Invertebrate Pathology 1996, 68(2): 101-108.
- [22] Couche G.A., P.R. Lehrbach, R.G. Forage, et al., Occurrence of intracellular inclusions and plasmids in *Xenorhabdus* spp. Journal of General Microbiology 1987, 133: 967-973.
- [23] Cowles K.N., Goodrich-Blair R.H., Expression and activity of a *Xenorhabdus nematophila* haemolysin required for full virulence towards *Manduca sexta* insects. Cell Microbiol. 2005, 7(2): 209-19.
- [24] Daborn P.J., Waterfield N., Blight M.A., et al., Measuring Virulence Factor Expression by the Pathogenic Bacterium *Photorhabdus luminescens* in Culture and during Insect Infection. Journal of Bacteriology 2001, 183: 5834-5839.
- [25] Davies J., Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. Science 1994, 264: 375-382.
- [26] Davies J., Vicious circles: looking back on resistance plasmids. Genetics 1995, 139: 1465-1468.
- [27] Dunphy G.B., Interaction of mutants of *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae) with antibacterial systems of *Galleria mellonella* larvae (Insect: Pyralidae). Can. J. Microbiol, 1994, 40: 161-168.
- [28] Dunphy G.B., Miyamoto C.M., Meighen E.A., Generation and properties of a luminescent insect pathogen *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). J. Gen. Appl. Microbiol. 1998, 44(4): 259-268.
- [29] Dutky S.R., Insect Microbiology. Adv. Appl. Microbiol, 1959, 1: 175-200.

- [30] East P.D., Toxin genes from the bacteria *Xenorhabdus nematophilus* and *Photorhabdus luminescens*. Patent: US 6630619, 07-OCT-2003.
- [31] Ehler R.U., The influence of phase variants of *Xenorhabdus* spp. and *Escherichia coli* (enterobacteriaceae) on the propagation of entomopathogenic nematodes of the genera *Steinernema* and *Heterohabditis*. Rev. Nematol. 1990, 13: 417-424.
- [32] Ehlers R.U., Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001, 56: 623-33.
- [33] Ehlers R.U., Wyss U., Stackebrandt E., 16s rRNA cataloguing and the phylogenetic position of the genus *Xenorhabdus*. Syst. Evol. Microbiol. 1988, 50: 1691-1692.
- [34] Ehrhardt A.F., Sanders C.C., Beta-Lactam resistance amongst *Enterobacter* species. J. Antimicrob. Chemother. 1993, 32 (Suppl B): 1-11.
- [35] Eric C.M., K. Heungens, and H. Goodrich-Blair, Early Colonization Events in the Mutualistic Association between *Sternernema carpocapsae* Nematodes and *Xenorhabdus nematophila* Bacteria. Journal of Bacteriology, 185(10): 3147-3154
- [36] ffrench-Constant R., Bowen D., *Photorhabdus* toxins: novel biological insecticides. Curr. Opin. Microbiol. 1999, 2(3): 284-288.
- [37] ffrench-Constant R.H., Waterfield N., Burland V., et al., A genomic sample sequene of the Entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* W14: potential implications for virulence. Applied and Environmental Microbiology 2000, 66(8): 3310-3329.
- [38] Fischer L.S.M., Arteaga-Hernandez E., The bacterial symbiont *Xenorhabdus poinarii* (Enterobacteriaceae) is harbored by two phylogenetic related host nematodes: The entomopathogenic species *Steinernema cubanum* and *Steinernema glaseri* (Nematode: *Steinernematidae*). FEMS Microbiol. Ecol. 1999, 29: 149-157.
- [39] Forst S., B. Dowds, N. Boemare, et al., *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: Bugs that kill bugs. Annu. Rev. Microbiol. 1997, 51: 47-72.
- [40] Forst S., Nealson K., Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp.. Microbiological Reviews 1996, 60(1): 21-43.
- [41] Forst S., Waukau J., Leisman G., et al., Functional and regulatory analysis of the OmpF-like porin, OpnP, of the symbiotic bacterium *Xenorhabdus nematophilus*. Mol. Microbiol. 1995, 18(4): 779-789.
- [42] Forst S.A., Tabatabai N., Role of the histidine kinase, EnvZ, in the prodution of outer membrane proteins in the symbiotic-pathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophilus*. Applied and Environmental Microbiology 1997, 63(3): 962-968.
- [43] Francis M.S., A.F. Parker, R. Morons, et al., Bacteriophage Lambda as a Delivery Vector for Tn10-Derived Transposons in *Xenorhabdus bovienii*. Applied and Environmental Microbiology 1993, 59(9): 3050-3055.
- [44] Francis M.S., A.F. Parker, R. Morons, et al., Bacteriophage Lambda as a Delivery Vector for Tn10-Derived Transposons in *Xenorhabdus bovienii*. Applied and Environmental Microbiology

- 1993, 59(9): 3050-3055.
- [45] Gerritsen L.J.M., Wolf J.M., Vuurde J.V., et al., Polyclonal antisera to distinguish strains and form variants of *Photorhabdus (Xenorhabdus) luminescens*, Applied and Environmental Microbiology 1995, 61(1): 284-289.
- [46] Givaudan A., A. Lanois, and N. Boemare, Cloning and nucleotide sequence of a flagellin encoding genetic locus from *Xenorhabdus nematophilus*: phase variation leads to differential transcription of two flagellar genes(fliCD). Gene 1996, 183: 243-253.
- [47] Givaudan A., Lanois A., flhDC, the flagellar master operon of *Xenorhabdus nematophilus*: requirement for motility, lipolysis, extracellular hemolysis, and full virulence in insects. Journal of Bacteriology 2000, 182(1): 107-115.
- [48] Givaudan A., S. Baghdiguian, A. Lanois, et al., Swarming and swimming changes concomitant with phase variation in *Xenorhabdus nematophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 1995, 61: 1408-1413
- [49] Goetsch M., Owen H., Goldman B., et al., Analysis of the PixA Inclusion Body Protein of *Xenorhabdus nematophila*. Journal of Bacteriology 2006, 188(7): 2706-2710.
- [50] Gootz T.D., Global dissemination of beta-lactamases mediating resistance to cephalosporins and carbapenems. Expert. Rev. Anti. Infect. Ther. 2004, 2(2): 317-327.
- [51] He H., Snyder H.A., Forst S., Unique organization and regulation of the mrx fimbrial operon in *Xenorhabdus nematophila*. Microbiology 2004, 150(Pt 5): 1439-1446.
- [52] Heungens K., Cowles C.E., Goodrich-Blair R.H., Identification of *Xenorhabdus nematophila* genes required for mutualistic colonization of *Steinernema carpocapsae* nematodes. Mol. Microbiol. 2002, 45(5): 1337-1353.
- [53] Hey T.D., Schleper A.D., Bevan S.A., et al., Mixing and matching tc proteins for pest control. Patent: WO 2004067727-A, 12-AUG-2004.
- [54] Hopwood D.A, Chater K.F., Fresh approaches to antibiotic production. Philos. Tras. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1980, 290-313.
- [55] Horinichi S., Hara O., Beppu T., et al., Cloning of a pleiotropic gene that positively controls biosynthesis of A⁻ factor. Actinorhodin and Prodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) and *Streptomyces lividans*. Journal of Bacteriology 1983, 155(3) : 1238.
- [56] Huovinen P., Sundstrom L., Swedberg G., et al., Trimethoprim and sulfonamide resistance. Antimicrob. Agents. Chemother. 1995, 39(2): 279-289.
- [57] Hutchinson C.R., Borell C.W., Otten S.L., et al., Drug discovery and development through the genetic engineering of antibiotic- production microorganisms. J. Med. Chem. 1989, 32(5): 929.
- [58] Hwang S.Y., Paik S., Park S.H., et al., N-phenethyl-2-phenylacetamide isolated from *Xenorhabdus nematophilus* induces apoptosis through caspase activation and calpain-mediated Bax cleavage in U937 cells. Int. J. Oncol. 2003, 22(1): 151-157.
- [59] Isaacson P.J., Webster J.M., Antimicrobial activity of *Xenorhabdus* sp. RIO (Enterobacteriaceae), symbiont of the entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* (Rhabditida:

- Steinernematidae). J. Invertebr. Pathol. 2002, 79(3): 146-153.
- [60] Jaurin B., Grundstrom T., Normark S., Sequence elements determining ampC promoter strength in *E. coli*. EMBO. J. 1982, 1(7): 875-881.
- [61] Ji D., Yi Y., Kang G.H., et al., Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-pathogenic bacteria. FEMS Microbiol Lett., 2004, 239(2): 241-248.
- [62] Jones G.H., Hopwood D.A., Activation of phenoxazinone synthase expression in *Streptomyces lividans* by cloned DNA sequences for *Streptomyces antibioticus*. J. Biol. Chem. 1984b, 259(22) :141-158.
- [63] Jones G.H., Hopwood D.A., Molecular cloning and expression of the phenoxazinone synthase gene from *S. antibioticus*. J. Biol. Chem. 1984a, 259(22) : 141-151.
- [64] Joumana N., Samaha-Kfoury, Araj G.F., Recent developments in β -lactamases and extended spectrum β -lactamases. B.M.J. 2003, 327: 1209-1213 .
- [65] Kado C.I., Liu S.T., Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. Journal of Bacteriology 1981, 145(3): 1365-1373.
- [66] Kanehisa M., Grand challenges in bioinformatics. Bioinformatics 1998, 14(4): 309.
- [67] Keith H.O., D.M. Roche, D.J. Clarke, et al., The *ner* Gene of *Photobacterium*: Effects on Primary-Form-Specific Phenotypes and Outer Membrane Protein Composition. Journal of Bacteriology, 2002, 184(11): 3096-3105.
- [68] Khandelwal P., Choudhury D., Birah A., et al., Insecticidal pilin subunit from the insect pathogen *Xenorhabdus nematophila*. Journal of Bacteriology 2004, 186(19): 6465-6476.
- [69] Khandelwal P., Nirupama B., Insecticidal Activity Associated with the Outer Membrane Vesicles of *Xenorhabdus nematophilus*. Applied and Environmental Microbiology 2003, 69(4): 2032-2037.
- [70] Kim D.J., Boylan B., George N., et al., Inactivation of *ompR* promotes precocious swarming and *flhDC* expression in *Xenorhabdus nematophila*. Journal of Bacteriology 2003, 185(17): 5290-5294.
- [71] Krasomil-Osterfeld K.C., Influence of osmolarity on phase shift in *Photobacterium luminescens*. Appl. Environ. Microbiol. 1995, 61: 3748-3749.
- [72] Leclerc M.C., Boemare N.E., Plasmids and phase variation in *Xenorhabdus* spp. Appl. Environ. Microbiol. 1991, 57: 2592-2601.
- [73] Li J.X., Chen G.H., Webster J.M., et al., Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiont. Journal of Natural Products 1995, 58(7): 1081-1086.
- [74] Li J.X., Chen G.H., Webster J.M., Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). Canadian Journal of Microbiology 1997, 43(8): 770-773.
- [75] Linda C.K., Mansel W.G., Growth of Autobioluminescent *Campylobacter jejuni* in Response to Various Environmental Conditions. Journal of Food Protection 2003, 66(7): 1190-1197.

- [76] Lino T., Kutsukake K., Flagellar phase variation in Salmonella: a model system regulated by flip-flop DNA inversions, In K. Mizobuchi, I. Watanabe, and J. D. Watson (ed.). Nucleic acid research, future development. Academic Press, Inc., New York, 1983. pp: 395-406.
- [77] Lopez R.J., Otto A.A., Hague N.G.M., Evaluation of the *Steinernema feltiae*/*Xenorhabdus bovienii* complex against the fungus *Phoma betae* on sugar beet seedlings. Tests of Agrochemicals and Cultivars. Annals of Applied Biology Supplement, 1997, 18: 48-49.
- [78] Marokhazi J., Waterfield N., LeGoff G., et al., Using a DNA Microarray To Investigate the Distribution of Insect Virulence Factors in Strains of *Photorhabdus* Bacteria. Journal of Bacteriology 2003, 185(15): 4648-4656.
- [79] Martens E.C., Gawronski-Salerno J., Vokal D.L., et al., *Xenorhabdus nematophila* requires an intact iscRSUA-hscBA-fdx operon to colonize *Steinernema carpocapsae* nematodes. Journal of Bacteriology 2003, 185(12): 3678-3682.
- [80] Martens E.C., Goodrich-Blair H., The *Steinernema carpocapsae* intestinal vesicle contains a subcellular structure with which *Xenorhabdus nematophila* associates during colonization initiation. Cell Microbiol. 2005, 7(12): 1723-1735.
- [81] Mazodier D., Davies J., Gene capture in : Response. Trends Microbiol. 1999, 7(3): 95.
- [82] McInerney B.V., Taylor W.C., Lacey M.J., Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., part 1. Dithiopyrrolone Derivatives with antibiotic Activity. Journal of Natural Products 1991a, 54: 774-784.
- [83] McInerney B.V., Taylor W.C. Lacey M.J., Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., part 2. Benzopyran-1-one Derivatives with gastroprotective activity. Journal of Natural Products 1991b, 54: 785-795.
- [84] Meslet-Cladiere L.M., Pimenta A., Duchaud E., et al., In vivo expression of the mannose-resistant fimbriae of *Photorhabdus temperata* K122 during insect infection. Journal of Bacteriology 2004, 186(3): 611-622.
- [85] Minoru K., Bork P., Bioinformatics in the post-sequence era. Nature Genetics 2003, 33(s): 305.
- [86] Moeen A.H., R.J. Stuart and R. Gaugler, Antibiotic resistance and protease production by *Photorhabdus luminescens* and *Xenorhabdus poinarii* bacteria symbiotic with entomopathogenic nematodes: variation among species and strains. Soil Biol. Biochem. 1998, 30: 1955-1961.
- [87] Morgan J.A., Ellis D., Jarrett P., et al., Biological control of nematodes. Patent: WO 0042855-A, 27-JUL-2000b.
- [88] Morgan J.A., Ellis D., Jarrett P., Insecticidal agents. Patent: WO 0030453-A, 02-JUN-2000a.
- [89] Morgan J.A.W., M. Sergeant, D. Ellis, et al., Sequence Analysis of Insecticidal Genes from *Xenorhabdus nematophilus* PMFI296. Applied and Environmental Microbiolog 2001, 67(5): 2062-2069.
- [90] Ng K.K., Webster J.M., Antimycotic activity of *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae) metabolites against *Phytophthora infestans* on potato plants. Journal of Plant Pathology 1997, 19 (2): 125-132.

- [91] Nishimura Y., Hagiwara A., Suzuki T., et al., *Xenorhabdus Japonicus* sp. Nov. associated with the nematode *Steinernema kushidai*. World Journal of Microbiological Biotechnology 1994, 10: 207-210.
- [92] Orchard S.S., Goodrich-Blair H., Identification and functional characterization of a *Xenorhabdus nematophila* oligopeptide permease. Appl Environ Microbiol. 2004, 70(9): 5621-5627.
- [93] Owuama C.I., Invasion of insect blood tissue by *Xenorhabdus bovienii*. Res Microbiol. 2003, 154(3): 183-189.
- [94] Pan Y.H., Jian H., Zhang J., et al., An intracellular protein (Xin) with remarkable inhibition on growth of *Helicoverpa armigera* was isolated from *Xenorhabdus nematophilus* strain BJ. Progress in Natural Science 2002, 12 (4): 310-312.
- [95] Paterson D.L., Bonomo R.A., Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 2005, 18(4): 657-686.
- [96] Paul V.J., Frautschy W. F., Neilson K.H., Antibiotics in microbial ecology: isolation and structure assignment of several new antibacterial compounds from the insect-symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. Journal of Chemical Ecology 1981, 7: 589-597.
- [97] Payie K.G., Rather P.N., Clarke A.J., Contribution of gentamicin 2'-N-acetyltransferase to the O acetylation of peptidoglycan in *Providencia stuartii*. Journal of Bacteriology 1995, 177(15): 4303-4310.
- [98] Pinyon R.A., E.C. Linedale, M.A. Webster et al., Tn5-induced *Xenorhabdus bovienii* lecithinase mutants demonstrate reduced virulence for *Galleria mellonella* larvae. Journal of Applied Bacteriology 1996, 80: 411-417.
- [99] Pinyon R.A., Hew F.H., Thomas C.J., *Xenorhabdus bovienii* T228 phase variation and virulence are independent of RecA function. Microbiology. 2000, 146 (Pt 11): 2815-2824.
- [100] Plazinski J., Cen Y.H., Rolfe B.G., General Method for the Identification of Plasmid Species in Fast-Growing Soil Microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 1985, 49(4): 1001-1003.
- [101] Poinar G.O., Thomas G.M., Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteriaceae: Eubacteriales) in the development of nematode, DD136 (*Neoaplectama* sp., steinernatidae). Parasitology 1966, 56: 385-390.
- [102] Poinar G.O., Taxonomy and biology of *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*. in R. Gaugler and H. K. Kaya, eds. Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press, Boca Raton, FL, 1990, pp: 23-60.
- [103] Poole K., Resistance to beta-lactam antibiotics. Cell Mol. Life Sci. 2004, 61(17): 2200-2223.
- [104] Recchia G.D., Hall R.M., Gene cassettes: a new class of mobile element. Microbiology 1995, 141 (Pt 12): 3015-3027.
- [105] Rhodes, Stuart H., Akhurst R.J., et al., Process of making Xenorhabdin antibiotics. Australia. United States Patent, No. 4672130, 1987
- [106] Richardson W., Thomas H., Schmidt M., et al., Identification of an Anthraquinone pigment and a hydroxystilbene antibiotic from *Xenorhabdus luminescens*. Applied and environmental

- microbiology 1988, 54: 1602-1605.
- [107] Samuni A., A direct spectrophotometric assay and determination of Michaelis constants for the β -lactamase reaction. Anal. Biochem. 1975, 63(1): 17.
- [108] Schito G.C., The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect. 2006, 12: 3-8.
- [109] Sergeant M., P. Jarrett, M. Ousley, et al., Interactions of Insecticidal Toxin Gene Products from *Xenorhabdus nematophilus* PMFI296. Applied and Environmental Microbiology 2003, 69(6): 3344-3349.
- [110] Sheng Y., Wu Y., Daniel J.C., A fungal endoglucanase with plant cell wall extension activity. Plant Physiology 2001, 127: 324-333.
- [111] Sicard M., Tabart J., Boemare N.E., et al., Effect of phenotypic variation in *Xenorhabdus nematophila* on its mutualistic relationship with the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. Parasitology 2005, 131: 687-6894.
- [112] Smigielski A.J., Akhurst R.J., Megaplasms in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp., bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes (families *Steirnermatidae* and *Heterorhabditidae*). Journal of Invertebrate Pathology. 1994, 64: 214-220.
- [113] Smigielski A.J., Akhurst R.J., Toxin gene from *Xenorhabdus nematophilus* Patent: US 5972687 , 26-OCT-1999.
- [114] Smiglielski A.J., Phase variation in *Xenorhabdus nematophilus* and *Photorhabdus luminescens*: differences in respiratory activity and membrane energization. Appl. Environ. Microbiol. 1994, 60: 120-125.
- [115] Spratt B.G., Resistance to antibiotics mediated by target alterations. Science 1994, 264: 399-93.
- [116] Sundar L., Chang F.N., Antimicrobial activity and biosynthesis of indole antibiotics produced by *Xenorhabdus nematophilus*. J. Gen. Microbiol. 1993, 139: 3139-3148.
- [117] Tabatabai N., Forst S., Molecular analysis of the two-component genes, ompR and ENvZ, in the symbiotic bacterium *Xenorhabdus nematophilus*. Mol. Microbiol. 1995, 17: 643-652.
- [118] Thaler J., Alain G., Marie-Pascale L., Antimicrobial pseudopeptides. France, International patent, No Wo 02/055545 A1, 2002.
- [119] Thaler J.O., Baghdiguan S., Boemare N., Purification and characterization of xenorhabdinin, a phage tail-like bacteriocin, from the lysogenic strain F1 of *Xenorhabdus nematophilus*. Applied and Environmental Microbiology 1995, 61(5): 2049-2052.
- [120] Thaler J.O., New antimicrobial barriers produced by *Xenorhabdus* spp. And *photorhabdus* spp. To secure the monoxenic development of entomopathogenic nematodes Symbiosis 1997, 22: 205-215.
- [121] Thomas G.M., Jr G.O., Poinar. *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic nematophilic bacteria of the family *Enterobacteriaceae*. International Journal of Systematic Bacteriology 1979, 29: 352-360.
- [122] Towbin H., Staehelin T., Gordon J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels

- to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 1979, 76 (9) : 4350-4354.
- [123] Valerie J.P., Isolation and structure assignment of several new antibacterial compounds from the insect-symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. Journal of Chemical Ecology 1981, 7(3): 589-597.
- [124] Vivas E.I., Goodrich-Blair H., *Xenorhabdus nematophilus* as a model for host-bacterium interactions: rpoS is necessary for mutualism with nematodes. Journal of Bacteriology 2001, 183(16): 4687-4693.
- [125] Volgyi A., A. Fodor, and S. Forst, Inactivation of a novel gene produces a phenotypic variant cell and affects the symbiotic behavior of *Xenorhabdus nematophilus*. Applied and Environmental Microbiology 2000, 66(4): 1622-1628.
- [126] Volgyi A., Fodor A., Szentirmai A., et al., Phase Variation in *Xenorhabdus nematophilus*. Applied and Environmental Microbiology 1998, 64: 1188-1193.
- [127] Wang H., Dowds B.C.A., Phase Variation in *Xenorhabdus luminescens*: Cloning and sequencing of the Lipase Gene and Analysis of Its Expression in Primary and Secondary Phases of the Bacterium. Journal of Bacteriology 1993, 175(6): 1665-1673.
- [128] Waterfield N.R., Bowen D.J., Fetherston J.D., et al., The tc genes of *Photorhabdus*: a growing family. Trends in Microbiology 2001, 9(4): 185-191.
- [129] Weaver J.C., Electroporation: A general phenomenon for manipulating cells and tissues. J. Cell. Biochem., 1993, 51: 426-35
- [130] Webster J.M., Dithiolopyrrolones and their corresponding monoxides and dioxides as antineoplastic agents. Australia. International patent, No Wo 99/12543, 1999.
- [131] Webster J.M., Li J.X., Chen G.H., Indole derivatives with antibacterial and antimycotic properties. Australia. United States Patent No.701834, 1996b.
- [132] Webster J.M., Li J.X., Chen G.H., Indole derivatives with antibacterial and antimycotic properties. Australia. United States Patent, No. 569668, 1996a
- [133] Webster J.M., The role of metabolites from the bacterial symbionts during nematode development. In : 10th International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control Japan, 1998, 136-162.
- [134] Xu J., Hurlbert R.E., Toxicity of irradiated media for *Xenorhabdus* spp.. Appl. Environ. Microbiol. 1990, 56: 815-818.
- [135] Xu J., M.E. Olson. M.L. Kahn., et al., Characterization of Tn5-Induced Mutants of *Xenorhabdus nematophilus* ATCC19061. Applied and Environmental Microbiology 1991, 57(4): 1173-1180.
- [136] Xu J., S. Lohrke, I.M. Hurlbert, et al., Transformation of *Xenorhabdus nematophilus*. Applied and Environmental Microbiology 1989, 55(4): 806-812.
- [137] Yamashita F., Hotta K., Karasance S., et al., New antibiotic-producing *Streptomyces* selected by antibiotic resistance as a marker. I. New antibiotic production generated by protoplast fusion treatment between *Streptomyces griseus* and *Streptomyces tenjimariensis*. J. Antibiot. 1985, 38(1): 58.

- [138] Ying B., Douglas P.L., Fu H., Gary P.R., An improved Tn7-based system for the single-copy insertion of cloned genes into chromosome of Gram-negative bacteria. *Gene* 1991, 109: 167-168.
- [139] Zinser E.R., Kolter R., Prolonged stationary-phase incubation selects for *lrp* mutations in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 2000, 182:4361-4365.
- [140] 崔龙, 邱礼鸿, 房媛媛, 等, *Xenorhabdus nematophilus* BP 品系杀虫毒素基因的克隆与鉴别. *中山大学学报* 2003a, 47-50.
- [141] 崔龙, 邱礼鸿, 辛智海, 等, 昆虫病原线虫共生菌 BP 品系杀虫毒素基因簇中各基因与杀虫活性的关系. *微生物学报* 2003b, 43(6): 747-752.
- [142] 顾觉奋, 获取抗生素的新途径——沉默基因的激活. *国外医药抗生素分册* 2003, 24(5): 193-197.
- [143] 胡志浩, 陶美凤, 鲍锴, 等, 一个巨大的抗真菌抗生素基因簇及其与植物生物技术的潜在关系. *高技术通讯* 1996: 41-45.
- [144] 黄健强, 毛应清, 姜卫红, 等, 微生物的自身耐药机制. *国外医药抗生素分册* 1998, 19(6): 470-474.
- [145] 李季伦, 张伟心, 杨启瑞, 等, 微生物生理学. 北京农业大学出版社, 1993.
- [146] 刘峥, 简恒, 杨秀芬, 等, 致病杆菌和光杆状菌发酵液对几种害虫的生物活性. *植物保护学报* 2003, 30(1): 19-23.
- [147] 刘峥, 嗜线虫致病杆菌 CB6 菌株杀虫活性相关分子机制 [博士学位论文]. 北京: 中国农业科学院, 2003.
- [148] 吕秋军, 简恒, 刘卫京, 等, 从嗜线虫杆菌分离的吡啶衍生物抗肿瘤活性的研究. *中国新药杂志* 2002, 11: 850-852.
- [149] 吕淑君, 陈能, 从具沉默抗性基因的链霉菌中筛选新的抗菌物质. *中国抗生素杂志* 1996, 21(suppl): 62.
- [150] 庞在堂, 杨怀文, 杨秀芬, 等, 一株高毒力致病杆菌 CB6 的鉴定. *微生物学报* 2004, 44(2): 131-135.
- [151] 萨姆布鲁克, 拉塞尔 著, 黄培堂, 等 译. 分子克隆实验指南. 科学出版社, 北京, 2002.
- [152] 沈炳福, 李捷, 竺海蓉, 阴沟肠杆菌 Tn5- *nif* A 重组质粒的构建及其 *nifA* 的表达分析. *植物生理学报* 1995, 21(2):154-158.
- [153] 汪家政, 范明, 蛋白质技术手册. 科学出版社, 北京, 2001: 79-88.
- [154] 王立霞, 杨秀芬, 简恒, 等, 昆虫病原线虫共生细菌的代谢产物. *微生物学报* 2001, 41(6): 753-756.
- [155] 闫春玲, 林敏, 宛煜嵩, 等, 固氮斯氏假单胞菌四碳二羧酸转移酶 DctPQM 的跨膜结构分析与功能研究. *科学通报* 2003a, 48(11): 1186-1190.
- [156] 闫春玲, 林敏, 徐玉泉, 等, 转 *dct* 结构基因固氮斯氏假单胞菌工程菌株构建及其特性研究. *高技术通讯* 2003b, 10: 36-40.
- [157] 杨怀文, 张志文, 杨秀芬, 等, 嗜线虫杆菌代谢物对马铃薯晚疫病的抑制作用. *中国生物防治* 2000, 16(3): 111-113.
- [158] 杨秀芬, 简恒, 张善稿, 等, 嗜线虫致病杆菌代谢物对病原菌的抑制作用及稳定性研究. *植*

- 物保护 21 世纪展望, 北京: 中国科学技术出版社, 1998: 689-692.
- [159] 杨秀芬, 杨怀文, 简恒, 等, 嗜线虫杆菌发酵液对苎麻疫霉的抑制作用. 中国生物防治 1998, 14 (1): 21-24.
- [160] 杨秀芬, 杨怀文, 简恒, 等, 嗜线虫致病杆菌代谢物拮抗大豆疫霉. 大豆科学 2002, 21(1): 52-55.
- [161] 张部昌, 赵志虎, 马清钧, 红霉素生物合成的分子生物学. 生物技术通讯 2001, 12 (2): 151-160.
- [162] 张杰, 彭于发, 赵建周, 等, 用接合转移方法构建杀虫防病荧光假单胞菌. 农业生物技术学报 1995, 3 (2): 75-81.
- [163] 张蔚文, 放线菌次生代谢的分子遗传学研究进展(上). 国外医药抗生素分册 1997a, 18(1): 1-4.
- [164] 张蔚文, 放线菌次生代谢的分子遗传学研究进展(下). 国外医药抗生素分册 1997b, 18(3): 161-170.

致 谢

本论文是在导师杨怀文研究员的悉心指导下完成的。导师扎实渊博的专业知识、对学科前沿敏锐的洞察力,乐观豁达的生活态度、宽厚待人的做人准则,无时无刻不在影响着我。从她那里我学到的不仅仅是从事科研工作的基本素质,更重要的是思考问题的方法。在三年的学习生活中,从科研工作到日常的学习生活都给了我事无巨细的指导和帮助。我所有的工作和成绩都凝聚着她的心血,当给论文添上最后一笔的时候,特向杨老师表示衷心的感谢!

感谢杨秀芬副研究员、刘峥副研究员、袁京京助理研究员、邱德文研究员、曾凡荣研究员、蒋伶活研究员、曾洪梅研究员等各位老师把实验室营造成一个温暖的大家庭。是您们在实验中给予我无私的帮助,在生活中给予兄弟姐妹般的悉心关照。我论文的每一页都凝结着您们的智慧和劳动。您们对我的帮助我终生难忘,衷心地祝愿您们幸福平安!

感谢朝夕共处的徐锋、冯飞、顾成波、赵利辉、董建申、张宁、龙承祖、杨保军、肖罗、王业建、左斌、李丽、龙松华、黄炜、陈梅、仲新华、杨勇、郭广君、吕素芳、孙柏欣、谢馥交、曹立波、陈武、张志刚、毛建军、刘文平、李承雷、武晓丽、尚威、金鑫、赵明治、姚庆等亲密战友给我提供的帮助。感谢周红运女士在实验中为我提供的便利。

在质粒转化方法摸索中,中国农科院植物保护研究所张杰研究员、生物技术所林敏研究员惠赠菌株和质粒并给予指点和帮助;在粘粒文库构建中,中国科学院动物研究所付国强研究员在技术上给予建议和帮助;在核酸序列测定中,中国农科院作物研究所贾继增研究员提供便利和帮助。在此谨表示深深的谢意!

感谢好友孙学辉副研究员、李红权博士、李孟军博士、张新建博士为本论文提出的建议和帮助。感谢同窗桂富荣副教授、杨国庆博士、杨宝东博士、张炬红博士、吴伟明副研究员、张运雄副研究员、胡根海博士、何福红博士等给我的友谊和欢乐!

在博士课程学习和论文研究工作期间,研究生院的老师们为我提供了许多便利条件,植物保护所的领导、特别是科研处的梁小慧老师给予了许多关照,在此表示感谢。还要感谢原工作单位河北省农林科学院和华北-安万特药业有限公司领导和同事们不断的关心和帮助。

感谢我的妻子多年来对我的理解和支持。在我攻读博士学位的三年期间,不但独自承担了家庭和教育孩子的重任,还保证了全家三人各自的学业进展顺利。特别是我的女儿龚效凡的健康成长是我完成学业过程中最大的慰藉。

最后感谢多年来关心、支持、帮助我的远方的父母和家人!谨以此文献给今生难以再尽孝道的父亲!

龚永兴

2006年6月于北京