

玉米内生菌 YY1 转座子突变体库的创制及分析

Establishment and analysis of the transposon mutant library of maize endophytic YY1 strain

吴文娜¹ 赵莹² 王会敏¹ 陈瑶瑶¹ 郝志敏^{1*} 董金皋^{1*}

(1. 河北农业大学, 河北省植物生理与分子病理学重点实验室, 保定 071001; 2. 渤海理工职业学院, 河北黄骅 061100)

Wu Wenna¹ Zhao Ying² Wang Huimin¹ Chen Yaoyao¹ Hao Zhimin^{1*} Dong Jingao^{1*}

(1. Hebei Provincial Key Laboratory for Plant Physiology and Molecular Pathology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei Province, China; 2. Bohai Polytechnic Vocational College, Huanghua 061100, Hebei Province, China)

植物内生菌因与宿主植物长期共处而形成互利的共生关系, 内生菌通过分泌抗菌活性物质抑制土壤中土传病原菌的生长, 减少病原菌对作物的侵染。转座子技术是一种研究目的基因的分子手段, 已广泛用于芽胞杆菌的功能基因组学研究。携带 Mini-Tn10 转座子的载体 PIC333 质粒, 含有 ColE1 复制起点、温度敏感型复制子以及壮观霉素和红霉素抗性基因。质粒 PIC333 进入芽胞杆菌细胞后, 当培养温度高于 35℃ 时, 其温度敏感型复制子因无法复制被消除, 而 ColE1 复制起点和壮观霉素抗性基因位于转座子内部, 不受高温影响(马欣等, 2011)。本课题组前期从玉米健康植株中分离到 1 株有广谱抗菌活性的枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 菌株 YY1 (候美玲, 2012), 为明确其拮抗活性的调控机制, 本试验拟利用载体 PIC333 质粒创制 YY1 突变体库, 寻找菌株 YY1 拮抗活性调控的关键基因, 以期菌株 YY1 的遗传改良及其拮抗活性的提高提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株及培养基: 玉米大斑病菌 *Setosphaeria turcica* 菌株 01-23、枯草芽胞杆菌菌株 YY1, 由本实验室分离保存; PIC333 质粒由河北农业大学生命科学学院高同国博士惠赠。马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 培养基: 葡萄糖 20 g、马铃薯 200 g、琼脂粉 13 g、蒸馏水 1 L; LB (Luria-Bertani) 液体培养基: 酵母提取物 5 g、胰蛋白胨 10 g、NaCl 10 g、ddH₂O 1 L; LB 培养基: LB 液体培养基中加入 20 g/L 琼脂。

试剂及仪器: 质粒小提试剂盒、Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、引物、限制性内切酶, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 其余试剂均为国产

化学分析纯。DYY-300D 水平电泳系统, 北京东方瑞利科技有限公司; 170-8195 凝胶成像系统、165-2100 电击仪, 美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

菌株 YY1 的电转化: 菌株 YY1 感受态细胞制备参照马欣等 (2011) 方法。取 500 μL 感受态细胞加入 2 μL PIC333 质粒, 混匀后转至 2 mm 电转杯中, 以不同电压、电阻、电容进行电击。然后将混合物迅速转移至 2 mL LB 液体培养基中, 在 28℃、100 r/min 条件下培养 90 min, 将菌液涂布于含 100 μg/mL 壮观霉素的 LB 平板上, 28℃ 过夜培养, 筛选转化子。挑取抗壮观霉素转化子单菌落, 接种于含 100 μg/mL 壮观霉素的 LB 液体培养基中, 在 28℃、220 r/min 条件下过夜培养, 取长势良好的抗性稳定转化子备用。

创制转座子突变体库: 取抗壮观霉素的转化子菌液, 按 1% 接种至 LB 液体培养基中, 在 50℃、220 r/min 条件下过夜培养, 高温连续诱导 10 代后将菌液编号并分别接种于含 100 μg/mL 壮观霉素、5 μg/mL 红霉素的 LB 平板上, 37℃ 静置培养过夜。抗壮观霉素且对红霉素敏感的视为高温诱导成功的突变体, 收集突变体单克隆, 低温冷藏备用。计算转座效率, 转座效率 = (壮观霉素抗性转化子数量 - 高温诱导后保留壮观霉素/红霉素双重抗性的转化子数量) / 壮观霉素抗性转化子数量 × 100%。

突变体拮抗活性检测: 取菌株 YY1 和随机挑选的突变体单菌落接种于 LB 液体培养基中, 在 37℃、220 r/min 条件下培养过夜。收集菌液以 10 000 r/min 离心 5 min, PBS 缓冲液洗涤沉淀 2 次, 将菌体悬浮于 PBS 缓冲液中, 调整 OD_{600 nm} 至 0.5。取 25℃ 下培养 7 d 的玉米大斑病菌平板, 加入 ddH₂O, 刮取菌丝, 2 层

纱布过滤,即得到病菌孢子悬浮液,将其与PDA培养基混合,制成孢子浓度为 1×10^4 个/mL的PDA平板,分别接种YY1及突变体的菌悬液5 μ L,25 $^{\circ}$ C黑暗培养5 d,观察抑菌圈,每处理重复3次。选取拮抗活性发生变化的突变体进行PCR验证。Spc-F/R引物:5'-GCATTAATGAATCGGCCAACG-3'/5'-GTGGGTAAACCGTGAATATCG-3'。25 μ L反应体系:突变体DNA 1 μ L、SPC-F/SPC-R各1 μ L、 $2 \times$ Mix 12.5 μ L, ddH₂O补至25 μ L;扩增程序:95 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s,55 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸150 s,35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10 min,16 $^{\circ}$ C连接10 min。

突变体转座子插入位点分析:利用细菌DNA提取试剂盒提取突变体基因组DNA。*Hind* III酶切突变体基因组DNA,酶切产物于16 $^{\circ}$ C连接。转化大肠杆菌*Escherichia coli*感受态DH5 α 并进行反向PCR。引物FXTn10-F/R:5'-CGTTGGCCGATTCATTAATGC-3'/5'-CG-ATATTCACGGTTTACCCAC-3'。反应体系及程序同上。PCR产物送北京六合华大基因测序,测序所得序列与GenBank中相关基因组序列进行BLAST比对。

2 结果与分析

2.1 突变体库的创制

菌株YY1在电压为1 250 V、电阻为200 Ω 、电容为25 μ F时转化率最高,达 5.3×10^4 CFU/g DNA。抗性筛选共获得1 021个壮观霉素抗性转化子,高温诱导后,383个转化子仍有壮观霉素/红霉素双重抗性,仅保留抗壮观霉素的转化子638个,突变率为62.5%。

2.2 突变体的拮抗活性分析及插入位点确认

在随机挑选的260株突变体中未发现拮抗活性增强的菌株,突变体Y-48和突变体Y-101抗菌活性明显减弱(图1-A)。进一步进行壮观霉素抗性基因的验证,发现2株突变体DNA中均能扩增出2 100 bp的目的条带,野生型菌株DNA没有扩增产物,说明转座子已成功整合到突变体基因组DNA中(图1-B)。突变体Y-48和Y-101经反向PCR扩增得到约1 000 bp的产物(图1-C)。测序所得序列结果与枯草芽胞杆菌基因组(登录号CP017313.1、CP017312.1)的比对结果显示,2株突变体的转座子插入位点均位于分解代谢物控制蛋白(catabolite control protein A, CcpA)编码基因的起始密码子上游。

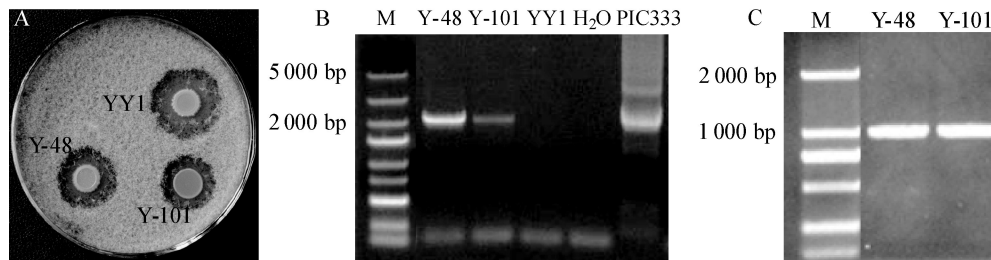


图1 菌株YY1突变体的拮抗活性(A)及其壮观霉素抗性基因的验证分析(B~C)

Fig. 1 The antimicrobial activity of YY1 mutants (A) and verification of their spectinomycin resistance genes (B~C)

M: Marker. Y-48, Y-101, YY1: 突变体; PIC333: 载体. Y-48, Y-101, YY1: Mutant; PIC333: carrier.

3 讨论

本试验基于转座子技术创制了菌株YY1突变体库,对部分突变体进行拮抗活性分析发现,有2株拮抗活性降低的突变体转座子插入位点均位于CcpA编码基因的起始密码子上游。CcpA是碳分解代谢阻遏(carbon catabolite repression, CCR)效应关键调控因子的分解代谢物控制蛋白,主要调控碳源分解代谢,参与细菌毒力作用、生物膜形成、芽胞形成等重要生理过程(程海舰等,2018)。2株突变体拮抗活性降低,推测CcpA与菌株YY1对植物病原真菌的拮抗活性呈正相关,下一步将深入验证该基因的相关功能。

参考文献 (References)

Cheng HJ, Peng Q, Zhang J, Song FP. 2018. Identification of gene reg-

ulated by Sigma54 and CcpA in *Bacillus thuringiensis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 58(3): 380-390 (in Chinese) [程海舰, 彭琦, 张杰, 宋福平. 2018. 苏云金芽胞杆菌Sigma54和CcpA共同调控的基因鉴定. *微生物学报*, 58(3): 380-390]

Hou ML, Xin YY, Hao ZM, Cao ZY, Shen S, Zhang SR, Dong JG. 2012. Antifungal activity substances of endophytic *Bacillus* in maize (*Zea mays*) and mechanisms against *Setosphaeria turcica*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 20(9): 1018-1027 (in Chinese) [侯美玲, 辛媛媛, 郝志敏, 曹志艳, 申坤, 张韶茹, 董金泉. 2012. 玉米内生芽胞杆菌的抗菌活性物质及其拮抗玉米大斑病菌机理的初步研究. *农业生物技术学报*, 20(9): 1018-1027]

Ma X, Liu J, Qiao JQ, Wu HJ, Gao XW. 2011. Construction of transposition insertion library of *Bacillus subtilis* by using transposon TnYLB-1. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 34(6): 77-81 (in Chinese) [马欣, 刘俊, 乔俊卿, 伍辉军, 高学文. 2011. 利用转座子TnYLB-1构建枯草芽胞杆菌的突变体文库. *南京农业大学学报*, 34(6): 77-81]

(责任编辑:李美娟)