

# 在苏云金芽胞杆菌中高效和稳定表达 AiiA 蛋白

吴怀光, 叶伟星, 喻子牛, 孙明

(华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

**摘要:** 【目的】摸索提高 AiiA 蛋白对 AHLs 分子的降解活性和对胡萝卜软腐欧文氏菌感染马铃薯产生病害的抑制能力的方法。【方法】苏云金芽胞杆菌的 AiiA 蛋白是一种胞内蛋白, 能降解参与诱导调控多种植物病原菌致病基因表达的 N-乙酰高丝氨酸内酯信号分子。本文采用两种方式来提高 AiiA 蛋白的活性, 即利用苏云金芽胞杆菌 S-层蛋白在细胞表面表达该蛋白以及利用苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白基因 *cry3Aa* 启动子来提高 *aiiA* 基因的表达量。为此构建该蛋白基因与细胞表面 S-层蛋白的锚定区结合而成的融合蛋白基因 *slh-aiiA* 以及带有基因 *cry3Aa* 启动子的融合基因 *pro3A-aiiA*。为了提高表达的稳定性以及去掉重组菌中非苏云金芽胞杆菌片段, 本文构建了解离载体 pBMB5401, 并将上述两个融合基因单独或同时装入解离载体 pBMB5401, 分别得到重组质粒 pBMBcaiiA, pBMB3aiiA 和 pBMB3439。转化苏云金芽胞杆菌无晶体突变株 BMB171, 随后导入温度敏感型辅助质粒 pEG922, 重组质粒在整合酶的作用下发生体内重组, 消除了抗性基因等非必需片段。【结果】得到 3 个重组菌 BMBcaiiAR, BMB3aiiAR 和 BMB3439R, 在无抗性选择压力下的稳定性均在 90% 以上。融合蛋白 SLH-AiiA 及 pro3A-AiiA 在解离后的重组菌中得到表达, 具有对 AHLs 分子的降解活性和对胡萝卜软腐欧文氏菌感染马铃薯产生病害的抑制能力。【结论】在苏云金芽胞杆菌中高效和稳定表达 AiiA 蛋白, 可增强其对 AHLs 分子的降解活性和对胡萝卜软腐欧文氏菌感染马铃薯产生病害的抑制能力, 当同时结合两种方式来表达 AiiA 蛋白时效果最好。

**关键词:** 苏云金芽胞杆菌; AiiA 蛋白; 融合蛋白; 解离载体

## High Efficient and Stable Expression of AiiA Protein in *Bacillus thuringiensis*

WU Huai-guang, YE Wei-xing, YU Zi-niu, SUN Ming

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

**Abstract:** 【Objective】The aim of this study is to grope associated methods in improving the protein AiiA ability of AHLs inactivation and restraint to the potato soft rot disease caused by *Erwinia carotovora*. 【Method】In this study, AiiA was displayed on cell surface by means of S-layer protein and its expression was boosted by promoter of *cry3Aa* gene, then *aiiA* gene was fused into *XbaI* site of *ctc* gene and *SpeI* site of *cry3Aa* gene respectively, obtaining fusion genes *slh-aiiA* and *pro3A-aiiA*. To improve the stability of AiiA expression, resolution vector pBMB5401 was constructed based on Tn5401. Fusion genes *slh-aiiA* and *pro3A-aiiA* were cloned into pBMB5401 by different ways, resulting in pBMBcaiiA, pBMB3aiiA and pBMB3439, which harbor *slh-aiiA*, *pro3A-aiiA* and both of them, respectively, and introduced into *Bacillus thuringiensis* acrySTALLIFEROUS strain BMB171. The site-specific recombination event occurs within two copies of IRS, thus allows for the selective elimination of undesired fragments on pBMB3439, pBMBcaiiA and pBMB3aiiA. 【Result】The expected strains named BMB3439R, BMBcaiiAR and BMB3aiiAR, respectively, and they are stable after 40 generation and reveal ability of AHLs inactivation and effective restraint to the potato soft rot disease caused by *E. carotovora*. 【Conclusion】To improve the protein AiiA ability of AHLs inactivation and its restraint to the potato soft rot disease caused by *E. carotovora*, it can be achieved by the method of high efficient and stable expression of AiiA protein in *B. thuringiensis*.

**Key words:** AiiA protein; AHLs; Transposon; Resolution plasmid

收稿日期: 2006-01-10; 接受日期: 2006-12-15

基金项目: 国家自然科学基金 (30270053) 和国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2006AA02Z174 和 2006AA10A212)

作者简介: 吴怀光 (1979-), 男, 湖北黄冈人, 硕士研究生, 研究方向为苏云金芽胞杆菌分子生物学。通讯作者孙明 (1966-), 男, 江西景德镇人, 教授, 博士, 研究方向为芽胞杆菌分子生物学。Tel: 027-87283455; Fax: 027-87280670; E-mail: m98sun@mail.hzau.edu.cn

## 0 引言

【研究意义】N-乙酰高丝氨酸内酯（N-acyl homoserine lactones, AHLs）是一类广泛存在于革兰氏阴性细菌数量感知（quorum-sensing）系统中的信号分子，此种信号分子由病原菌本身产生，可自由穿透细菌的细胞壁和细胞膜<sup>[1,2]</sup>。AHLs 分子参与许多病原菌致病基因的表达调控，当分子浓度达到一定阈值时，就可启动病原菌致病基因的表达<sup>[2]</sup>。苏云金芽胞杆菌（*Bacillus thuringiensis*）不同亚种中广泛存在着对 AHLs 分子有降解作用的非分泌性蛋白 AiiA，这类蛋白通过水解进入胞内的 AHLs 分子的内酯键，降低其浓度，使胡萝卜软腐欧文氏菌（*Erwinia carotovora* SCG1）的致病基因不能表达，从而阻止了软腐病原菌对植物的侵染<sup>[3,4]</sup>。然而天然 AiiA 蛋白是一种胞内蛋白并且表达量低，这两点极大限制了苏云金芽胞杆菌进一步用于植物真菌病害、细菌病害的防治。【前人研究进展】苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白基因 *cry3Aa* 启动子是一种不依赖芽胞形成的启动子，它相对其它 *cry* 基因的启动子有启动基因转录时间早，持续时间长的优点<sup>[5]</sup>，在构建苏云金芽胞杆菌基因工程菌时常被采用；因为 AiiA 蛋白是一种非分泌性蛋白，其非分泌性很大程度削弱了它降解环境中 AHLs 分子的效力。苏云金芽胞杆菌 S-层蛋白可形成晶格状结构覆盖在细胞表面，S-层蛋白 N 末端的信号肽和 S-层同源模体（S-layer homology motif, SLH）可用作细胞表面展示载体，笔者所在实验室已利用 S-层蛋白在苏云金芽胞杆菌细胞表面展示了多聚组氨酸肽<sup>[6]</sup>。在构建基因工程菌过程中，常用转座子作为载体，利用转座子的解离特性消除抗性基因。Tn5401 转座子是继 Tn4430 转座子后在苏云金芽胞杆菌中发现的另一新型转座子<sup>[7]</sup>，它们的转座机制及转座过程类似于 ClassII 转座子 Tn3<sup>[8]</sup>，利用转座子上解离酶识别的特征性序列（internal resolution sequence, IRS）构建的解离载体在解离过程中可将抗性基因等非必须片段消除<sup>[7,12]</sup>，从而消除了基因工程菌环境释放时抗性基因可能存在的安全隐患。【本研究切入点】天然 AiiA 蛋白表达量低且不分泌到胞外，本文拟构建工程菌以实现 AiiA 蛋白的高效表达；在构建工程菌过程中常利用转座子的解离特性来消除抗性基因以实现稳定表达目的蛋白。【拟解决的关键问题】由于 Tn4430 转座子广泛存在于除以色列亚种以外的苏云金芽胞杆菌各亚种中，这给基于 Tn4430 转座子构建的解离载体转化苏云金芽

胞杆菌库斯塔克亚种（*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*）野生菌带来很大困难。本研究选用 Tn5401 转座子上解离酶识别的特征性序列构建了解离载体 pBMB5401，并以此为平台对如何提高 AiiA 蛋白对 AHL 分子的降解活性进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

1.1.1 菌株和质粒 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、*Bacillus thuringiensis* BMB171（无晶体无质粒突变株，见文献[9]）、*Erwinia carotovora* SCG1（新加坡国立大学张炼辉博士惠赠，见文献[3]）、根癌农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）WCF47（pCF372/pCF218）（含有 *PtraI-lacZ* 融合基因和 *traR* 基因，卡那霉素抗性、壮观霉素抗性、四环素抗性，见文献[10]）、大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ （pJZ365）（含 *traI* 基因，庆大霉素抗性，由美国康奈尔大学 Stephen C Winans 教授惠赠，见文献[10]）、pGEMT-aii（含 *aiiA* 基因，氨苄青霉素抗性，本室张琼博士构建）、pEG922（含 Tn5401 转座子及解离酶识别的特征序列 IRS，温度敏感型复制子，氨苄青霉素抗性、四环素抗性、氯霉素抗性，Baum J A 惠赠，见文献[7, 8]）、pEG854.9（含苏云金芽胞杆菌复制子 Baum J A 惠赠，见文献[7, 8]）、pBMB982-304（含 *ctc* 基因，见文献[11]）、pHT305A（含 *cry3Aa* 基因，氨苄青霉素抗性、红霉素抗性，见文献[5]）。

1.1.2 引物设计 根据 IRS 的序列设计引物 P1 和 P2，并在 P1 中引入 *Sal* I 和 *Apa* I 酶切位点，在 P2 中引入 *Hind*III 位点。为检测质粒上的四环素抗性基因在解离过程中是否被消除，根据质粒 pEG922 上四环素抗性基因的序列设计引物 P3 和 P4。为获得 *slh-aii* 融合基因，根据 pGEMT-aii 中 *aiiA* 基因序列设计引物 P5，P6 和 P7，在 P5 中引入 *Xba* I 位点以与质粒 pBMB982-304 中 *ctc* 基因上的 *Xba* I 位点融合，在 P6 中引入 *Spe* I 以与质粒 pHT305A 中 *cry3Aa* 基因启动子下游的 *Spe* I 位点融合，在 P7 中引入 *Apa* I 和 *Sph* I 位点。

P1: 5'-AGCGTCGACGGGCCCTGCATGTTTGCC TTATTTATAG-3'；

P2: 5'-AGTCAAGCTTTGCATAAATACCTCCTC TTTT-3'；

P3: 5'-GTAATGAATGTAACAGGGTTCAATTA-3'；

P4: 5'-TGGAACAAAAGATTTGAATTCCT-3'；

P5: 5'-CGGCTCTAGACATGACCGTAAAGAAG

CTTTA-3'；

P6: 5'-CGGCACTAGTCATGACCGTAAAGAAG  
CTTTA-3'；

P7: 5'-AGCTGCATGCGGGCCCCTATGTATACT  
CCGGGAACA-3'。

## 1.2 DNA 操作及蛋白质检测

质粒的提取、酶切、连接、转化、PCR 和蛋白 SDS-PAGE 均参照文献[6]的方法。

## 1.3 质粒电脉冲转化苏云金芽胞杆菌

按照文献[12]所述方法进行。

## 1.4 质粒稳定性检测

参考文献[12]所述方法。

## 1.5 重组菌分解 AHLs 分子的活性检测

分解 AHLs 分子的活性检测参照文献[13]所述方法进行。

## 1.6 重组菌对胡萝卜软腐欧文氏菌致病性的抑制实验

取大小适当的马铃薯若干，用水仔细清洗，再用 70% (v : v) 乙醇反复进行表面消毒。在无菌操作台上，在平板中铺入无菌滤纸，加 2 ml 无菌水以保持平板湿润，用无菌打孔器将马铃薯切成厚度约为 0.5 cm 的圆状，然后放入平板中备用。取胡萝卜软腐欧文氏菌菌株 SCG1 的 16 h 培养物 20  $\mu$ l 分别与相同 OD 值的重组菌等体积混合，28 $^{\circ}$ C 作用 1、2 和 4 h 后各取 20  $\mu$ l 接种马铃薯，36 h 后观察病灶。

# 2 结果与分析

## 2.1 AiiA 蛋白基因与 S-层蛋白基因及 pro3A 启动子融合基因的构建

将质粒 pEG922 上 tet-IRS 片段用 *Sac* I 和 *Sal* I 克隆至 pUC19 获得载体 pBMB25，再将扩增片段 IRS 插入 pBMB25 的 *Sal* I 及 *Hind*III 位点，得到两个 IRS 同向排列的载体 pBMB5401。将引物 P5 和 P7 扩增片段 *aiaA* 基因与 pBMB982-304 质粒上 *ctc* 基因的 *Xba* I 连接得到融合基因 *slh-aiaA* (*slh* 片段包含了 S-层蛋白信号肽和锚定所必需的序列)。将引物 P5 和 P7 扩增片段 *aiaA* 基因与质粒 pHT305A 中 *cry3Aa* 基因启动子下游的 *Spe* I 位点融合，得到带有 *cry3Aa* 启动子的融合基因 *pro3A-aiaA*。然后将融合基因 *slh-aiaA* 用 *Sal* I 和 *Apa* I 插入到 pBMB5401 两 IRS 之间的 *Sal* I，*Apa* I 位点（接着用 *Apa* I 单酶插入 *pro3A-aiaA* 可得到含这两个融合基因的质粒），将 *pro3A-aiaA* 用 *Apa* I 单酶切插入 pBMB5401 的 *Apa* I 位点，最后用 *Sal* I 插入质

粒 pEG854.9 上苏云金芽胞杆菌的复制区，得到含有 *slh-aiaA* 基因的重组质粒 pBMBc*aiaA*，含有 *pro3A-aiaA* 基因的重组质粒 pBMB3*aiaA* 和同时含有这两个基因的重组质粒 pBMB3439（图 1）。

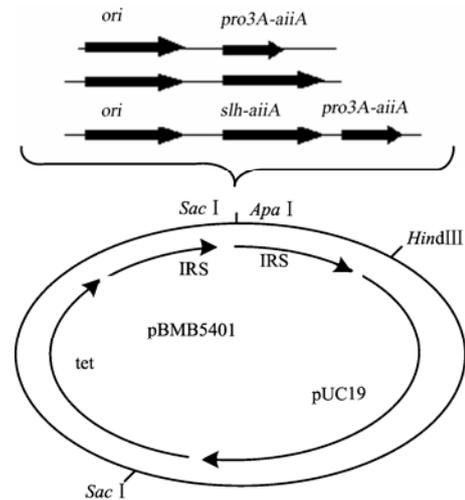


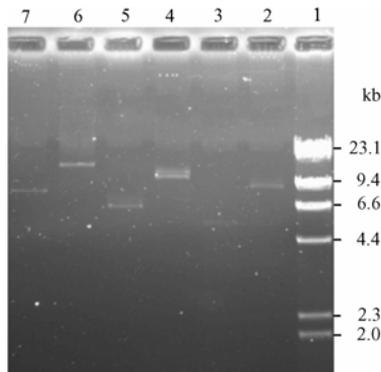
图 1 重组质粒 pBMBc*aiaA*，pBMB3*aiaA* 及 pBMB3439 构建示意图

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pBMBc*aiaA*，pBMB3*aiaA* and pBMB3439

## 2.2 含有融合基因的解离质粒在 BMB171 中的解离及解离前后质粒的稳定性

将质粒 pBMB3439 转化 BMB171，用四环素筛选得到的转化子命名为 BMB371，然后在 BMB371 中转入温度敏感型辅助质粒 pEG922，得到转化子命名为 BMB3439。将重组菌 BMB3439 在氯霉素抗性平板于 28 $^{\circ}$ C 培养 24 小时，在辅助质粒 pEG922 上 *Tnp* I 解离酶的作用下，重组菌 BMB3439 中的质粒 pBMB3439 在两同向的 IRS 序列之间发生重组，消除了选择标记四环素抗性基因、一个拷贝的 IRS 序列及 pUC19 等非必需片段，得到重组菌 BMB2439。将重组菌 BMB2439 在 LB 培养基平板上于 37 $^{\circ}$ C 划线培养过夜，挑取单菌落接种于氯霉素抗性平板于 28 $^{\circ}$ C 培养，不生长的则说明对应的单菌落中的辅助质粒 pEG922 已经丢失，然后把此单菌落接种到四环素抗性平板上，不生长则说明 pBMB3439 质粒上四环素抗性基因被消除，将得到的单菌落记为 BMB3439R。对菌株 BMB3439R 抽质粒单酶切验证表明质粒 pBMB3439 发生了解离，丢掉了 4.9 kb 的片段，得到解离后的质粒 pBMB3439R（图 2）。

将重组菌 BMB371 和 BMB3439R 在无抗性 LB 液体培养基中传代 40 代后, 稀释涂于 LB 平板培养至长出单菌落, 分别随机挑取 100 个单菌落点种四环素抗性平板和进行 PCR 验证, 结果表明重组菌 BMB371 的 100 个单菌落中 94% 仍然有四环素抗性, 而解离后的重组菌 BMB3439R 的 100 个单菌落中 92% 能扩增出 IRS 这一特异条带 (数据未显示), 表明解离前的质粒 pBMB3439 和解离后的质粒 pBMB3439R 可在 BMB171 中稳定遗传。重组质粒 pBMBcaiiA 及 pBMB3aiiA 的解离和解离前后质粒的稳定性检测同上, 解离后得到的重组菌记为 BMBcaiiAR 和 BMB3aiiAR, 解离后得到的重组菌 BMBcaiiAR 和 BMB3aiiAR 中的质粒记为 pBMBcaiiAR 和 BMB3aiiAR 对重组菌 BMBcaiiAR 和 BMB3aiiAR 抽质粒单酶切验证表明质粒 pBMBcaiiA 及 pBMB3aiiA 发生了解离, 丢掉了 4.9 kb 的片段的抗性片段 (图 2)。



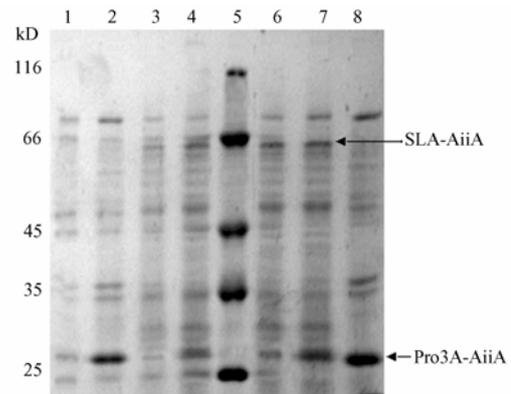
1.  $\lambda$ HindIII DNA marker; 2. pBMB3aiiA/Sac I (10.1 kb); 3. pBMB3aiiAR/Spe I (5.2 kb); 4. pBMBcaiiA/Sac I (11.1 kb); 5. pBMBcaiiAR/Spe I (6.2 kb); 6. pBMB3439/Sac I (12.8 kb); 7. pBMB3439R/Sph I (7.9 kb)

图 2 重组质粒 pBMB3439、pBMBcaiiA 及 pBMB3aiiA 解离验证  
Fig. 2 Resolution confirmation of recombinant plasmid pBMB3439, pBMBcaiiA and pBMB3aiiA

### 2.3 重组菌 BMB3439R, BMBcaiiAR 和 BMB3aiiAR 融合蛋白的表达

重组菌 BMB3439R、BMBcaiiAR 和 BMB3aiiAR 分别用 LB 液体培养基在 28℃ 培养 24 h, SDS-PAGE 结果显示重组菌能表达 SLH-AiiA (58 kD) 及 pro3A-AiiA (28 kD) 融合蛋白 (图 3)。检测培养至 60 h (芽胞形成中期) 时蛋白表达情况, SDS-PAGE 结果显示 BMB3aiiAR 和 BMB3439R 重组菌 pro3A-AiiA 蛋白表达量相当, 并比 24 h 时增加, 但

SLH-AiiA 融合蛋白的表达量无论在 BMBcaiiAR 还是在 BMB3439R 中仍维持在较低水平 (图 3)。



1. BMB171 培养 24 h; 2. BMB3aiiAR 培养 24h; 3. BMBcaiiAR 培养 24 h; 4. BMB3439R 培养 24 h; 5. 蛋白质重量标记; 6. BMBcaiiAR 培养 60 h; 7. BMB3439R 培养 60 h; 8. BMB3aiiAR 培养 60 h  
1. BMB171 cultured 24 h; 2. BMB3aiiAR cultured 24 h; 3. BMBcaiiAR cultured 24 h; 4. BMB3439R cultured 24 h; 5. Protein weight marker; 6. BMBcaiiAR cultured 60 h; 7. BMB3439R cultured 60 h; 8. BMB3aiiAR cultured 60 h

图 3 不同时期重组菌融合蛋白的 SDS-PAGE

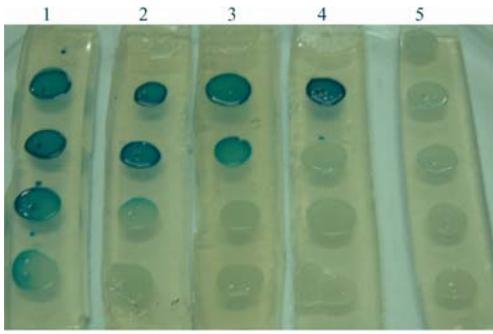
Fig. 3 SDS-PAGE of fusion protein in recombinant strain

### 2.4 重组菌 BMB3439R, BMBcaiiAR 和 BMB3aiiAR 分解 AHLs 分子的活性检测

分解 AHLs 分子的活性 (也叫 AiiA 活性) 检测结果 (图 4) 显示阴性对照 DH5 $\alpha$  (pJZ365) +H<sub>2</sub>O 蓝色扩散的最远, 表明其含有使指示菌 WCF47 变蓝的 AHLs 分子的量最多; 重组菌 BMB3aiiAR 和 DH5 $\alpha$  (pJZ365) 的混合物及重组菌 BMBcaiiAR 和 DH5 $\alpha$  (pJZ365) 的混合物也含有使指示菌 WCF47 变蓝的 AHLs 分子, 但其样品到指示菌 WCF47 蓝色最远端的距离均小于阴性对照, 但都大于重组菌 BMB3439R 与 DH5 $\alpha$  (pJZ365) 的混合物到指示菌 WCF47 蓝色最远端的距离, 表明重组菌 BMB3439R 的分解 AHLs 分子的活性要高于菌株 BMB3aiiAR 和 BMBcaiiAR。菌株 BMB171 与无菌水的混合物也不能使指示菌 WCF47 变蓝, 这说明苏云金芽胞杆菌 BMB171 不会产生 AHLs 分子, 从而排除苏云金芽胞杆菌自身产生 AHLs 分子造成对结果干扰的可能。

### 2.5 重组菌 BMB3439R, BMBcaiiAR 和 BMB3aiiAR 对胡萝卜软腐欧文氏菌致病性的抑制效果

为表述方便把 BMB3439R 记为 a, 把 BMBcaiiAR 记为 b, 把 BMB3aiiA 记为 c。比较重组菌在时间上对



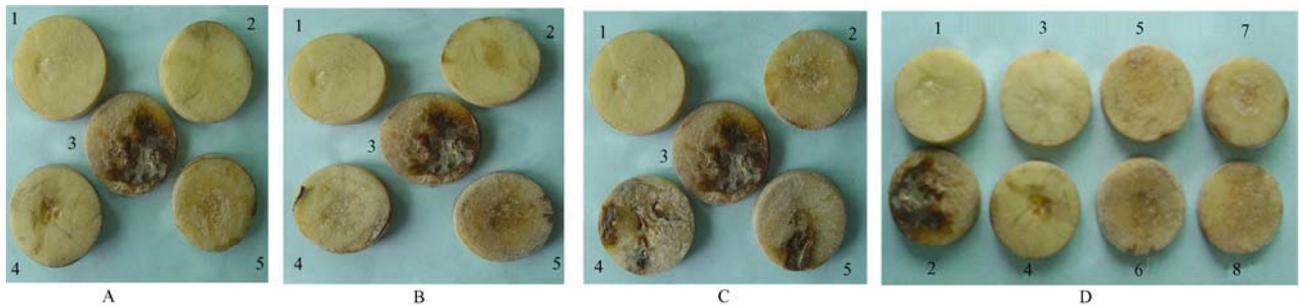
1. *E. coli* DH5 $\alpha$  (pJZ365) +sterile ddH<sub>2</sub>O; 2. *E. coli* DH5 $\alpha$ (pJZ365)+*B. thuringiensis* BMB3aiiAR; 3. *E. coli* DH5 $\alpha$ (pJZ365)+*B. thuringiensis* BMBcaiiAR; 4. *E. coli* DH5 $\alpha$ (pJZ365)+*B. thuringiensis* BMB3439R; 5. *B. thuringiensis* BMB171+sterile ddH<sub>2</sub>O

图 4 重组菌 BMB3439R, BMBcaiiAR 和 BMB3aiiAR 分解 AHLs 分子的活性检测

Fig. 4 Detection of AiiA activity in *Bacillus thuringiensis* strains BMB3434R BMBcaiiAR and BMB3aiiAR

胡萝卜软腐欧文氏菌致病性的抑制效果时,把培养 24 h 的重组菌 (OD 值约为 0.3) 分别与等体积 SCG1 菌液混合,作用 4、2、1 h 后接种马铃薯,36 h 观察结果 (图 5-A, B, C)。最后结果显示当作用 1 h, b 比 c

的效果好,但差于 a 的效果 (图 5-C); 当作用 2 h, b 和 c 的效果相当,但仍逊色于 a (图 5-B); 当作用 4 h, c 的效果好于 b,但差于 a (图 5-A)。这说明在 SLH-AiiA 和 pro3A-AiiA 表达量相当的情况下,防治效果依次为 a>b>c;随着 pro3A-AiiA 表达量的增加, c 显示出优势来,但仍没有 a 的效果好。这些表明 a 的效果最好,同时说明 a 中蛋白 pro3A-AiiA 和 SLH-AiiA 的表达在对 AHLs 分子的降解过程中并没有相互产生拮抗作用。研究蛋白表达量与抑制效果的关系时,取芽胞形成期中期 (约 60 h) 的重组菌以及营养期末期的重组菌 (约 24 h) (使 OD 约为 0.3) 与 SCG1 作如下混合 (1b60 表示 60 h 时 1 倍体积的 b,下同): 1a60+SCG1; 1a24+SCG1; 1b60+SCG1; 1b24+SCG1; 1c60+SCG1; 1c24+SCG1; 作用 4 h 接种马铃薯,36 h 观察结果 (图 5-D)。结果表明,pro3A-AiiA 蛋白表达量的增加有利于阻止胡萝卜软腐欧文氏菌对马铃薯的侵染,同时也说明了 SLH-AiiA 蛋白的表达并没有抑制 pro3A-AiiA 蛋白对 AHLs 分子的降解作用,SLH-AiiA 蛋白表达量未增加导致重组菌 BMBcaiiAR 在营养期末期和芽胞形成期中期两个不同时期的抑制效果差别不明显。



A. 各重组菌培养 24 h 后与 SCG1 混合液作用马铃薯 4 h; B. 各重组菌培养 24 h 后与 SCG1 混合液作用马铃薯 2 h; C. 各重组菌培养 24 h 后与 SCG1 混合液作用马铃薯 1 h; D. 培养 60 h 和 24 h 的重组菌与 SCG1 的混合液作用马铃薯 4 h 效果比较

图中数字表示对照以及培养不同时间的重组菌和 SCG1 混合液作用马铃薯的效果

A. Culture (24 h) mixed with SCG1, action 4 h; B. Culture (24 h) mixed with SCG1, action 2 h; C. Culture (24 h) mixed with SCG1, action 1 h;

D. Comparison of culture (60 h) mixed with SCG1 and culture (24 h) mixed with SCG1, action 4 h

A, B and C 1. sterile ddH<sub>2</sub>O 2. BMB3439R (24 h)+SCG1 3. SCG1 4. BMB3aiiAR (24 h)+SCG1 5. BMBcaiiAR (24 h)+SCG1

In (D) 1. ddH<sub>2</sub>O 2. SCG1 3. BMB3439R (60 h)+SCG1 4. BMB3439R (24 h)+SCG1

5. BMB3aiiAR (60 h)+SCG1 6. BMB3aiiAR (24 h)+SCG1 7. BMBcaiiAR (60 h)+SCG1 8. BMBcaiiAR (24 h)+SCG1

图 5 重组菌 BMB3439R、BMBcaiiAR 和 BMB3aiiAR 对胡萝卜软腐欧文氏菌 SCG1 软腐病的抑制效果检测

Fig. 5 Detection of BMB3439, BMBcaiiAR and BMB3aiiAR against the soft rot disease caused by *Erwinia corotovora* SCG1

### 3 讨论

苏云金芽胞杆菌作为传统杀虫剂已得到广泛应用, AiiA 蛋白的发现和为其应用于植物真菌病害、细菌病害防治带来了新的线索。本研究利用苏云金芽胞

杆菌中不同特性的启动子对 *aaiA* 基因进行了改造,克服了天然 AiiA 蛋白表达量低以及不能分泌到胞外与 AHLs 分子直接作用的缺陷。研究结果表明,同时利用杀虫晶体蛋白基因 *cry3Aa* 启动子和苏云金芽胞杆菌 S-层蛋白基因 *ctc* 的启动子对 *aaiA* 基因进行改造获

得的工程菌 BMB3439R 抗软腐病效果比 BMB3aiiAR 和 BMBcaiiAR 好。实验表明,融合蛋白 SLH-AiiA 的表达不影响 pro3A-AiiA 的表达,SLH-AiiA 蛋白和 pro3A-AiiA 蛋白在同一工程菌中表达对 AHLs 分子的降解活性并不产生拮抗作用。同时实验结果还表明当 SLH-AiiA 蛋白和蛋白 pro3A-AiiA 表达量相当的时候,重组菌 BMBcaiiAR 比 BMB3aiiAR 更能有效阻止胡萝卜软腐欧文氏菌感染对马铃薯的侵染,这主要是因为重组菌 BMBcaiiAR 中的 SLH-AiiA 融合蛋白借助了 S-层蛋白的表面展示功能<sup>[6]</sup>,能与环境中 AHLs 分子直接发生作用从而提高了降解效率。研究结果表明提高 AiiA 蛋白对 AHLs 分子的降解活性应从两方面入手,既要提高 AiiA 蛋白的胞内表达量,又要充分发挥 SLH-AiiA 蛋白的作用,暗示着增加 SLH-AiiA 蛋白表达量可以进一步提高抗染腐病能力。从 SDS-PAGE 结果来看融合蛋白 SLH-AiiA 的表达量一直不高,这很可能与宿主菌有关。CTC 表面层蛋白本身有很高的表达量, *slh-aiiA* 融合基因也包含了 *ctc* 基因的启动子,可能因为受体菌无晶体突变株 BMB171 所提供的  $\sigma$  因子不适合 *ctc* 基因的启动子,笔者所在实验室正开展 *ctc* 基因的中断工作, *ctc* 基因的中断菌株有可能是最理想的宿主菌。再者本研究基于 Tn5401 转座子构建的解离质粒在转化库氏塔克亚种野生菌时可以克服由于宿主菌含有 Tn4430 转座子而难以筛选转化子的困难。本研究结果将为最终构建既杀虫又抗病的多功能安全高效的基因工程菌带来新的希望。

## 4 结 论

本研究选用 Tn5401 转座子上解离酶识别的特征性序列构建了解离载体 pBMB5401,并以此为平台利用杀虫晶体蛋白基因 *cry3Aa* 启动子增强了 AiiA 蛋白在胞内的表达;同时利用 S-层蛋白锚定区域 SLH 构建融合蛋白 SLH-AiiA,实现了胞内蛋白 AiiA 在细胞表面的表达。本文通过对这 2 种方式 3 种组合的研究,证实了每种解离后的重组菌都可稳定表达 AiiA 蛋白,并且证实了当同时结合两种表达 AiiA 蛋白的方式来构建重组菌时,可实现比单独一种表达方式更好的效果。

## References

- [1] Fuqua C, Winans S C, Greenberg E P. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annual Review of Microbiology*, 1996, 50: 727-751.
- [2] Robson N D, Cox A R. Bacterial N-acyl-homoserine-lactone-

dependent signaling and its potential biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 1997, 15: 458-464.

- [3] Dong Y H, Gusti A R, Zhang Q. Identification of Quorum-Quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(4): 1754-1759.
- [4] Lee S J, Park S Y, Lee J J. Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8): 3919-3924.
- [5] Agaisse H, Lereclus D. Structural and functional analysis of the promoter region involved in full expression of the *cryIIIa* toxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology*, 1994, 13(1): 97-107.
- [6] 王 莉, 孙 明, 喻子牛. 利用 S-层蛋白在苏云金芽胞杆菌表面展示多聚组氨酸肽. *实验生物学报*, 2003, 36(6): 466-481.  
Wang L, Sun M, Yu Z N. Cell surface display of poly His-peptide by using s-layer protein of *Bacillus thuringiensis* strain CTC. *Acta Biologicae Experimentis Sinica*, 2003, 36(6): 466-481. (in Chinese)
- [7] Baum J A. TnpI recombinase: identification of sites within Tn5401 required for TnpI binding and site-specific recombination. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177: 4036-4042.
- [8] Baum J A, Coyle C S. Novel cloning vector for *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56: 3420-3428.
- [9] 李 林, 杨 超, 刘子铎, 李阜棣, 喻子牛. 苏云金芽胞杆菌无晶体突变株的逐级升温筛选及转化性能. *微生物学报*, 2000, 40(1): 85-90.  
Li L, Yang C, Liu Z D, Li B D, Yu Z N. Screening of acrySTALLIFEROUS mutants from *Bacillus thuringiensis* and their transformation properties. *Acta Microbiologica Sinica*, 2000, 40(1): 85-90. (in Chinese)
- [10] Zhu J, Beaber J W, More M I. Analogs of the autoinducer 3-Oxo-octanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(20): 5398-5405.
- [11] 孙 明, 朱晨光, 喻子牛. 类似 S-层蛋白的苏云金芽胞杆菌胞晶体蛋白基因的克隆. *微生物学报*, 2001, 41(2): 141-147.  
Sun M, Zhu C G, Yu Z N. Cloning of S-layer protein like parasporal crystal gene in *Bacillus thuringiensis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2001, 41(2): 141-147. (in Chinese)
- [12] 吴 岚, 孙 明, 喻子牛. 利用苏云金芽胞杆菌 Tn4430 转座子构建含有 *cryIaC* 基因的解离载体. *微生物学报*, 2000, 40(3): 264-269.  
Wu L, Sun M, Yu Z N. Construction of *cryIaC* gene containing resolution vector by using Tn4430 transposon from *Bacillus thuringiensis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2000, 40(3): 264-269. (in Chinese)
- [13] Dong Y H, Xu J L, Li X Z. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(7): 3526-3531.