

超氧化物歧化酶与苏云金芽胞杆菌 高温诱导产黑色素相关

刘凤侠 杨文君 阮丽芳 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 为探讨苏云金芽胞杆菌高温诱导产黑色素机制, 利用含 mini-Tn10 转座子载体 pIC333 构建苏云金芽胞杆菌油松亚种 4CA1, 随机插入突变体库, 以寻找相关调控基因。通过高温诱导筛选得到 1 株在 42 °C 产黑色素减弱的菌株; 克隆得到 mini-Tn10 中断基因的部分序列, 通过测序及同源性比对分析, 确定中断基因为超氧化物歧化酶基因 *sodA2*。

关键词 黑色素; 转座子; 突变体库; 超氧化物歧化酶(SOD); 苏云金芽胞杆菌

中图分类号 Q 781 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)01-0039-05

苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 是一类广泛存在于土壤中的革兰氏阳性细菌, 它的一个显著特点就是能够在芽胞期产生对昆虫具有特异毒杀作用的晶体蛋白 (insecticidal crystal proteins, ICPs)。苏云金芽胞杆菌是世界上应用最广泛、最成功的微生物杀虫剂^[1]。

黑色素由各种类型的酚类或吡啶单体组成, 具有防止蛋白质降解、光子屏蔽、化学保护等作用, 特别是它对紫外线和辐射具有抵抗性^[2]。苏云金芽胞杆菌所产晶体蛋白具有杀虫能力, 但是晶体蛋白杀虫剂在施用易受到阳光中紫外线的破坏, 影响杀虫效果^[3]。为解决这一问题, 研究者们通过多种方法运用黑色素保护苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白免受紫外光破坏。如 Liu 等^[4]将苏云金芽胞杆菌和发酵产生黑色素的重组菌株混合来抵抗紫外线; Ruan 等^[5]将嗜麦芽假单胞菌 (*Pseudomonas maltophilia*) 的酪氨酸酶基因在苏云金芽胞杆菌中异源表达来提高菌株抵抗紫外线的能力; Zhang 等^[6]将酪氨酸酶基因和晶体蛋白基因在苏云金芽胞杆菌中共表达来实现抵抗紫外线的目的。Ruan 等^[7]研究发现通过高温诱导可使苏云金芽胞杆菌菌株产生黑色素, 而且研究表明大部分苏云金芽胞杆菌具有高温诱导产生黑色素的能力。

转座子是一类具有特定结构的核苷酸序列, 在

转座酶等作用下可以从基因组的一个位置转移到另一个位置, 因此又称为“跳跃基因”, 这也是自然界生物多样性的一个方面。

随着功能基因组测序, 大量未知基因功能需要破解。转座子作为可改造的分子在这一领域具有巨大应用空间。研究者可根据科研目的的不同, 构建不同功能的转座子。如巫益明等^[8]利用带有 mini-Tn10 转座子的载体构建芽胞杆菌突变体库寻找与芽胞萌发相关的基因。本研究以苏云金芽胞菌株 4CA1 为研究对象, 利用 mini-Tn10 转座子载体 pIC333 构建苏云金芽胞杆菌油松亚种 4CA1, 随机插入突变体库以寻找相关调控基因, 探讨高温诱导产黑色素机制。

1 材料与方法

1.1 菌株及质粒

苏云金芽胞杆菌油松亚种 4CA1 及大肠杆菌 DH5 α , 由作者所在实验室保藏; 质粒 pIC333 由中国农业科学院植物保护研究所宋福平教授惠赠, 其携带有 ColE1 复制起始位点和 mini-Tn10 转座子插入序列, 具有壮观霉素 (spectinomycin, Spc) 和红霉素 (erythromycin, Erm) 抗性^[9], 在本试验中用于构建突变体的温度敏感型的自杀性载体。常规培养时, 大肠杆菌于 37 °C 培养, 苏云金芽胞杆菌于 28 °C

收稿日期: 2011-04-06

基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”计划)(2011AA10A203863)和国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2009CB118902)

刘凤侠, 硕士研究生, 研究方向: 苏云金芽胞杆菌分子生物学. E-mail: me3303@yahoo.com.cn

通讯作者: 阮丽芳, 博士, 副教授. 研究方向: 苏云金芽胞杆菌分子生物学. E-mail: ranlifang@mail.hzau.edu.cn

培养。筛选产黑色素表型时,苏云金芽胞杆菌于 42 ℃ 培养。

1.2 培养基

在 LB 中加入 1% 酪氨酸即为产黑色素培养基。在 LB 培养基中加入相应抗生素作为选择培养基,用于转化子的筛选或重组菌株的培养。各抗生素除指明外,其终质量浓度为:氨苄青霉素(ampicillin, Amp) 100 μg/mL;红霉素 25 μg/mL;壮观霉素 100 μg/mL。

1.3 操作及试剂

本研究涉及到的分子生物学操作除特别说明外均参照文献 [10] 进行,研究中所需的各种限制性内切酶、DNA 连接酶、碱性磷酸酶、DNA 聚合酶、dNTP 等生化试剂为 TaKaRa、Promega 公司和 Sigma 公司产品。其他主要生化试剂购自北京原平皓、武汉天源、武汉亚法、上海生工、友媛生物科技公司,普通试剂均为国产试剂。

1.4 苏云金芽胞杆菌的电转化

苏云金芽胞杆菌电转化感受态的制备参照 Peng 等^[11]的方法。电转化时取 100 μL 感受态细胞,加入适量脱盐后的质粒 DNA (体积 ≤ 15 μL),混匀后加入到 0.2 cm 电转化杯中,置冰上 10 min; 1.8 kV 电击后迅速加入 1 mL 预热的 LB 培养基; 28 ℃、220 r/min 恢复培养 2 h; 取 200 μL 恢复培养物涂布含有 100 μg/mL 壮观霉素和 25 μg/mL 红霉素的 LB 抗性平板,于 28 ℃ 培养 12~16 h 后挑取转化子。

1.5 转座子插入突变

突变体的构建主要按照 Gominet 等^[12]的方法并作适当改进。挑取新鲜的转化子接种于含有红霉素抗性的 50 mL 的 LB 液体培养基中,28 ℃、220 r/min 培养 8 h; 按体积比 1 : 1 000 转接于 50.0 mL、无抗性的 LB 液体培养基中,42 ℃、220 r/min 培养 3~5 代,约 1.5~2.0 h; 依次再转接 2~3 次; 最后 1 次 1/1 000 转接,42 ℃、220 r/min 培养; 培养液稀释后涂布 Spc 抗性平板培养,将所得单菌落对点壮观霉素和红霉素抗性平板,对红霉素敏感而对壮观霉素具有抗性则为突变子。

1.6 黑色素表型差异菌株的筛选

将突变体库中的菌株接种至加入酪氨酸的 LB 平板上,平行样 1 份于 28 ℃ 培养,1 份 42 ℃ 培养,分

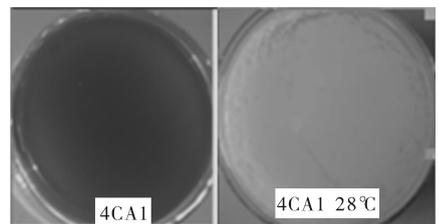
别筛选黑色素表型变化菌株。

2 结果与分析

2.1 4CA1 菌株转座子随机插入突变体文库的构建

将携带有 mini-Tn10 转座子的质粒载体 pIC333 电转化目标苏云金芽胞杆菌 4CA1,获得了具有壮观霉素和红霉素抗性的转化子,其形态与野生菌菌落一致。将其进行连续传代后,仍然具有壮观霉素和红霉素抗性,利用 mini-Tn10 序列扩增引物 S-1: 5'-TATTTGGAAGTTCAATAGTTG-GAG-3', S-2: 5'-TCCTTCCCCTTATCATACTACTC-3') 进行 PCR 扩增检测,显示该重组子含有载体中的片段,表明重组子为携带有 mini-Tn10 转座子载体 pIC333 的 4CA1 菌株。

苏云金芽胞杆菌油松亚种 4CA1,28 ℃ 下无产黑色素现象,经过 42 ℃ 高温诱导,可产生非常明显的黑色素(图 1)。转座子载体 pIC333 具有温敏复制子,带有壮观霉素 Spc 和红霉素 Erm 抗性基因。高温诱导后,mini-Tn10 片段插入基因组而保留在突变株中,而转座子载体外源片段将被消除,突变株只具有 Spc 抗性丢失 Erm 抗性。抗性初步筛选得到突变株。利用 pIC333 构建 4CA1 突变体库,转座频率约 4%~5%,本研究共获得约 500 株 4CA1 抗性突变株即具有壮观霉素抗性(Spc^r)、红霉素敏感(Erm^s)的菌株。



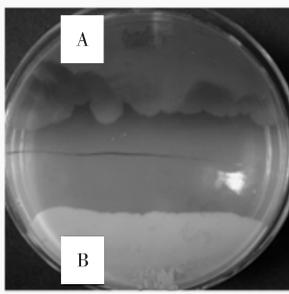
左:4CA1 在 42 ℃ 培养产生黑色素 Left:4CA1 could produce melanin at 42 ℃; 右:4CA1 在 28 ℃ 培养不产黑色素 Right:4CA1 could not produce melanin at 28 ℃.

图 1 4CA1 在 28 ℃ 和 42 ℃ 产黑色素状况

Fig. 1 Pattern of 4CA1 melanin production at 28 ℃ and 42 ℃

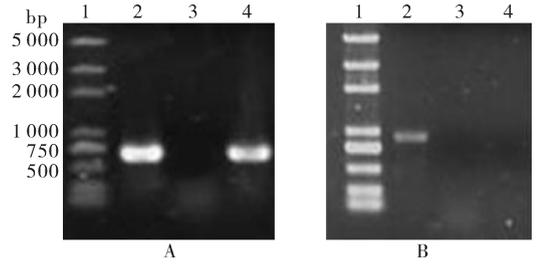
2.2 产黑性状突变株的筛选及验证

利用转座子 mini-Tn10 构建 4CA1 突变体库后,对得到的抗性突变株在加入酪氨酸的 LB 固体培养基中分别于 28 ℃ 和 42 ℃ 进行产黑色素性状差异筛选,得到 1 株在 42 ℃ 产黑减弱的突变菌株 BMB1227(图 2)。



A:4CA1 菌株 42 °C 产黑色素 4CA1 could produce melanin at 42 °C; B:BMB1227 菌株 42 °C 不产黑色素 BMB1227 could not produce melanin at 42 °C.

图 2 4CA1 及 BMB1227 42 °C 产黑色素状况
Fig. 2 Pattern of 4CA1 and BMB1227 melanin production



A: mini-Tn10 扩增 mini-Tn10 sequence amplification; B: 外源载体扩增 Vector sequence amplification; 1: Marker; 2: 阳性对照含有 pIC333 的 4CA1 重组菌株 4CA1 positive control, that contain the plasmid pIC333; 3: 阴性对照, 4CA1 菌株 Negative control, 4CA1; 4: BMB1227.

图 3 BMB1227 PCR 扩增结果

Fig. 3 DNA electrophoresis map of BMB1227 PCR production

```

TTATATCCTGCATACCGAATCAATTGGTGATTATAAAATTCGTATATTAATTTCTTCACCTTGATATTGC
TTAAAAATTGTAATGGTCGGTTTCACTTTTCCGTTGTTOGTTGCATATTGAATATGATGAATTAATGCATT
ATATACACCTTCCTCATCAITTACTTACAGTGCATCTAATATGTGCATCTTACTCCAAAATAGTCTTCCGA
TACATCGATTACTATGCGCCATGCCATTGCGGATCCGTGAACAAGTTCTTCAAATGTATGTTTCATACGT
CCCCGTCTTCTCAITTCAACTCGAATTTCTTTCATGCGTTCTTCTATGAATTTGTTTITAAGCTCTTT
ATAGCAAATCGTAATAAAATGACTCGCTTCTCTAATTAATGCTTCGTTTACTCATAAGGATCTCCTTC
TATTTCAACAAAAGCTTACTACTTTACAGTATAAGCAAAAAGAATAAGAGTCAACAAAGAAAGTCTAA
GTGTTACTTTTATTGTAATACTTTTACAGAAAATTAAGAGATTACTATTGACTTTTCATGAAAAATAGGTGTA
TTTTTACTCAGGTAATAATTATTTTTACCTAGACCAACTTTTAGAGGGAAAGGAGGAAATGTCATGTCCTT
CATTTCAATTGCCAAAAGCTTTCATATGACTATGATGAACTAGAGCCATATATOGATAGCAATACACTTTCT
ATTTCATCATGAAAGCACCATGCGACATACGTAATAATTGAAATGCCGACTAGAAAACCTATTTCGGAA
TTACACAATAAATCTTTAGAAGAGTTACTATGTAATTTAGAAGCTTTACCAAAGGACATTGTTACAGCT
GTCAGAAAATAACGGTGGTGGACATTATTGTCATAGTCTTTTTTGGGAAGTAATGAGCCACAGGGGTGG
CGGCGAGCCTAATGGAGACGTTGCAAAAAGTAATTGATTAATTTCAATACCTTTGACAACCTAAAAAGA
TCAACTGTCTAAAGCAGCAATTAGCCGTTTTTGGAAAGTGTTATGGATGGCTTGTCTTGATGGTGAAG
AACTTACTGTAATGAGTACACCTAATCAAGATACACCTTTGCAAGAAGGCAAAATTCACCTTACTGTCA
TTGATGTATGGGAACATGCCTATTATTTAAAGTACCAAAAATCGTTCGCCAGAAATTTGTTACCAACTGGTG
GCATACAGTGAACCTGGGACCGGGTAAATGAAAAATATTTACAAGCAATTCATCAAAAAACATTAGT
CGTGCATATAAGGTAAGTTTGGTAATGTAATAATAGTATTGTCGAAATCCTCCAGAATCCCCGGATTG
CCACCGGGGATTTATGATTATTTCAATGTCATGTATGTAATAACGTAATACTTTTTCCATTTCTATTTTCAA
CCCTCGAAACGGGAATCCTAATTCATTAGCTTTTCCATTATGTAATGTACAATTAGTCACTTCATTATAAG
GTGCTACATGATCTCCTACTTCTTGAATGAGTGATTTTATTTCCCGTATTTCTTCTATAAAATGAATAATTT
CCCGAGTAGAACTACCCCGTTGCTACAAGCATTAAATGGCCCTTCTATGCTTTTCATCCCACACCAAG
CTAAAAATTTCCCGGCTTCTTCTTCATGTATAAACGACAACCTCTCCATCTAGATGATTCAOGGCAACAG
GTTCTTTTCTTAAACAATATGTTCAACGTAAAG-TGTAACCTTTTGTATAAATCGTTTTTCTCCAATAACAACC
GGGAAAAOAGAACTGCAACGACTGGGAATGTTGCTTGTGAATACACTGCTTCGGCTACTCTC+

```

下划线代表 *sodA2* 基因编码区, 方框代表转座子插入位点 *SodA2* genetic coding areas were underlined, box represents transposon tagging sites.

图 4 BMB1227 中断基因序列

Fig. 4 Interrupt gene sequence in BMB1227

抽提 BMB1227 总 DNA, 利用 mini-Tn10 序列扩增引物 (S-1: 5'-TATTTGGAAGTTCAATAGT-TGGAG-3', S-2: 5'-TCCTTCCCACTTATCAT-ACCACTC-3') 和外源载体部分序列扩增引物 (ermF: 5'-ATGAACGAGAAAAATATAAAA-CAC-3', ermR: 5'-TTACTTATTAATAATT-TATAGCTATT-3') 分别扩增 mini-Tn10 序列以及外源载体部分序列。

从 PCR 扩增结果 (图 3) 可以看出, BMB1227 中可以检测到 mini-Tn10 序列, 而不能检测到其他外源载体部分, 这说明转座正常发生。

2.3 转座子插入序列克隆

抽提 BMB1227 总 DNA, 利用 mini-Tn10 序列上不存在的限制性内切酶 *EcoR* I 对其进行酶切。由于 mini-Tn10 上存在大肠杆菌复制子和 *Spc* 抗性基因, 因此将 DNA 片段自连后直接转化大肠杆菌 DH5 α , 挑选具有 *Spc* 抗性的转化子。利用 mini-Tn10 序列扩增引物 (S-1: 5'-TATTTGGAAGT-TCAATAGTTGGAG-3', S-2: 5'-TCCTTC-CCACTTATCATACCACTC-3') PCR 验证转化子是正确的。mini-Tn10 序列已知, 根据其末端序列设计引物 (数据未列出), 通过反向 PCR 获得插入基因的侧翼序列 (图 4), 在 mini-Tn10 转座子序列两端发现正向重复的核苷酸序列“CACGGGGTG”, 根据 mini-Tn10 转座子转座的特点, 判断此位点即为 Mini-Tn10 转座子发生转座事件的靶位点。此位点所在的序列含一个完整的开放阅读框, 将此开放阅读框在 NCBI 数据库进行 Blast 比对, 同苏云金芽胞杆菌、蜡样芽胞杆菌和炭疽芽胞杆菌中超氧化物歧化酶基因 *sodA2* 同源性达到 99% 以上。

3 讨论

苏云金芽胞杆菌在其最适培养温度 28 $^{\circ}\text{C}$ 一般不产黑色素, 而在 42 $^{\circ}\text{C}$ 高温诱导下可诱导出产黑表型。为了从分子水平解释这种调节机制, 本研究利用突变体库筛选产黑色素表型变化菌株, 从而寻找相关调控基因。利用 mini-Tn10 转座子载体 pIC333 构建 4CA1 突变体库, 在突变体库中筛选得到 1 株在 42 $^{\circ}\text{C}$ 产黑色素减弱的突变株。经过测序得到中断基因序列, 经过 NCBI 数据库比对确认该基因为超氧化物歧化酶基因 *sodA2*。

超氧化物歧化酶 SODs 存在于已经研究的需氧或厌氧菌中, 它们高度保守。根据文献报道, 超氧化

物歧化酶 (SODs) 催化活性氧类的超氧负离子生成过氧化氢和氧分子; 在超氧负离子直接地或通过产生更活泼的羟自由基/过氧化硝酸盐引起细胞损伤之前, SODs 能够有效地将其清除掉^[13]。这与黑色素具有抗氧化的功能, 能够清除羟基自由基, 抵抗次氯酸盐、高锰酸盐及其他氧化物的氧化作用, 防止新磷脂脂质体被过氧化的作用是一致的。Jacobson 等^[14]认为在致病链霉菌中黑色素和 SODs 在抗氧化方面功能相当; Munoz-Munoz 等^[15]指出在黑色素形成过程中产生超氧负离子, 而 SODs 催化其发生歧化反应生成过氧化氢和氧气, 从而 SODs 会影响到过氧化氢的生成速率。黑色素代谢途径可能存在于一个复杂的代谢调控网络中, 本研究中虽然由于 SODs 的缺失, 造成苏云金芽胞杆菌高温诱导产黑色素的表型发生变化, 但是 *sodA2* 基因也许并不直接参与黑色素生产途径, 而是调控了高温条件下某些基因的转录再影响色素的合成, 其分子机制有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 喻子牛, 孙明, 陈亚华, 等. 苏云金芽胞杆菌生物活性蛋白基因在动、植物病虫害防治中的应用综述[J]. 农业生物技术学报, 1995, 3(2): 100-110.
- [2] SICHEL G, CORSARO C, SCALIA M, et al. *In vitro* scavenger activity of some flavonoids and melanins against O $_2^{\cdot-}$ [J]. Free Radic Biol Med, 1991, 11(1): 1-8.
- [3] PUSZTAI M, FAST P, GRINGORTEN L, et al. The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals [J]. Biochem J, 2001, 273: 43-47.
- [4] LIU Y T, SUI M J, JI D D, et al. Protection from ultraviolet irradiation by melanin of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis* [J]. J Invert Patho, 1993, 162: 131-136.
- [5] RUAN L, HUANG Y, ZHANG G, et al. Expression of the *mel* gene from *Pseudomonas maltophilia* in *Bacillus thuringiensis* [J]. Letter in Appl Microbiol, 2002, 34(4): 244-248.
- [6] ZHANG J T, YAN J P, ZHENG D S, et al. Expression of *mel* gene improves the UV resistance of *Bacillus thuringiensis* [J]. J App Microbiol, 2008, 105: 151-157.
- [7] RUAN L, YU Z, FANG B, et al. Melanin pigment formation and increased UV resistance in *Bacillus thuringiensis* following high temperature induction [J]. Systematic Applied Microbiology, 2004, 27: 286-289.
- [8] 巫益明, 阮丽芳, 彭东海, 等. 苏云金芽胞杆菌 YBT-1518 的插入突变体库的构建及芽胞萌发突变株的筛选 [J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(5): 577-581.
- [9] STEINMETZ M, RICHTER R. Easy cloning of mini-Tn10 in-

- sersion from the *Bacillus subtilis* chromosome[J]. J Bacteriol, 1994, 176:1761-1763.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] PENG D H, LUO Y, GUO S, et al. Elaboration of an electroporation protocol for larger plasmids and wild-type strains in *Bacillus thuringiensis* [J]. J Appl Microbiol, 2009, 106: 1849-1858.
- [12] GOMINET M, SLAMTI L, GILOIS N, et al. Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis* *plcR* regulon and for virulence[J]. Mol Microbiol, 2001, 40: 963-975.
- [13] FANG F C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies[J]. Nat Rev Microbiol, 2004, 2: 820-832.
- [14] JACOBSON E S, JENKINS N D, TODD J M. Relationship between superoxide dismutase and melanin in a pathogenic fungus[J]. Infect Immun, 1994, 62(9): 4085-4086.
- [15] MUNOZ-MUNOZ J L, GARCIA-MOLINA F, VARON R, et al. Generation of hydrogen peroxide in the melanin biosynthesis pathway[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1794 (7): 1017-1029.

Superoxide dismutase and the melanin production in *Bacillus thuringiensis* induced by high temperature

LIU Feng-xia YANG Wen-jun RUAN Li-fang SUN Ming

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology/College of Life Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract *Bacillus thuringiensis* subsp. *yosoo* 4CA1 can not produce melanin at 28 °C, while it may possess high yield of melanin when induced at 42 °C. In order to study the mechanism of melanin production induced by high temperature, a random insertional mutant library of *B. thuringiensis* subsp. *yosoo* 4CA1 was constructed with plasmid pIC333 containing the mini-Tn10 transposon. Compared with the wild-type strain 4CA1, a mutant of producing melanin weakly at 42 °C was obtained. Then the flanking sequence of mini-Tn10 was cloned and sequenced. The results showed that the gene interrupted by mini-Tn10 was *sodA2*.

Key words melanin; transposon; mutant library; superoxide dismutase(SOD); *Bacillus thuringiensis*

(责任编辑: 张志钰)