

趋磁螺菌遗传操作体系的建立及磁小体缺失突变株的筛选

李 峰 李 颖 姜 伟 王珍芳 李季伦*

(中国农业大学生物学院 北京 100094)

摘 要 :由于 *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 缺少简便有效的遗传操作体系和对常见抗生素的抗性 ,致使对该菌磁小体生物合成的机制等研究工作进展缓慢。为此建立了一套比较简便有效的遗传操作体系 ,其中包括 :以平板封膜培养技术获得单菌落、在选择性培养液中进行接合转移遗传因子 ,以液体培养和磁铁吸附技术筛选突变子。利用此体系 ,通过接合转座诱变技术 ,获得了 2 个磁小体缺失突变株 ,为研究该菌磁小体合成的分子遗传学提供了技术支撑。

关键词 :*Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 磁小体缺失突变株 mini-Tn5 *lacZ* 2 接合转座突变

中图分类号 :Q933 **文献标识码** :A **文章编号** :0001-6209(2004) 04-0440-05

1975 年 Blakemore^[1]发现趋磁细菌(Magnetotactic bacteria) ,其体内含有按一定方式排列的磁小体 (Magnetosome)。由于磁小体的存在 ,使趋磁细菌能够沿着磁力线方向运动 ,以趋向于适合其生长的环境。趋磁细菌的这种特性引起了学者们的重视 ,从不同角度对趋磁细菌的形态分类^[2,3]、生理生化^[4]、遗传变异^[5]及磁小体的特性^[6]等进行了大量研究。在自然界中 ,除了趋磁细菌能合成磁性颗粒外 ,在海生的软体动物甲贝^[7]、蜜蜂的腹部^[8]、家鸽的头^[9]、海豚、蝴蝶及藻类^[10]体内 ,甚至在脊椎动物^[11]及人脑的海马组织中^[12]都发现了磁性颗粒 ,而趋磁细菌结构简单 ,为研究生物磁学的理想材料。特别是近年来在火星的陨石中发现了类似于趋磁螺菌磁小体的链状排列的磁性颗粒^[13] ,为火星上曾有过生物的推测提供了有力的证据。趋磁细菌的发现和研^究 ,对地质学也具有重要意义。地质学的一个重要研究领域是探索地磁场及铁矿石的形成原因。有人^[14,15]推测来源于趋磁细菌的磁小体和铁还原细菌一起 ,参与了海洋沉积物的磁化和矿化过程。此外 ,由于磁小体属纳米级(25nm ~ 120nm) ,大小均匀 ,具有较大的比面值 ,而且在颗粒外有生物膜包被^[6] ,不易聚集 ,因而在许多领域 ,诸如免疫检测^[16,17]、靶向治疗^[18]等方面具有潜在的应用价值。

虽然趋磁细菌合成的磁小体具有重要的理论意义和诸多潜在的应用价值 ,但由于趋磁细菌对营养的质量和氧分压要求十分苛刻 ,难以大量培养 ,不易获得大量细胞和磁小体。因此 ,制约了对趋磁

细菌及磁小体的研究和应用。这些问题只有在克隆出磁小体合成基因 ,构建基因工程菌才可望获得解决。而趋磁螺菌的模式菌株格瑞菲斯瓦尔德磁螺菌 (*Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1) 的遗传操作体系尚不完善 ,在固体培养基上难以形成菌落 ,缺少可供筛选的抗性菌株。为此本室开展了 *M. gryphiswaldense* MSR-1 的遗传操作体系的研究 ,建立起包括以固体平板封膜培养法形成单菌落、在选择培养基中进行 DNA 自供体菌向受体菌的接合转移和以磁铁吸附法直观判断有无磁小体合成等技术。依靠此项遗传操作体系 ,我们对 *M. gryphiswaldense* MSR-1 进行 mini-Tn5 转座插入诱变 ,首次获得了 2 个磁小体缺失突变株 ,为磁小体生物合成分子机制和其它遗传学的研究 ,提供了技术支撑。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 :*M. gryphiswaldense* MSR-1 (DSM6361) 购自 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen ;大肠杆菌 (*Escherichia coli*) CC118 (λ pir) 和质粒 pUT mini-Tn5 *lacZ*2 (Ap^r , Km^r) 由德国 GBF-National Research Centre for Biotechnology 的 Kenneth N. Timmis 教授赠送。

1.1.2 培养基 :*E. coli* CC118 (λ pir) 的培养基是 LC ,除氯化钠为 5g/L 外 ,其余成分与 LB 同。*M. gryphiswaldense* MSR-1 的培养基 (1) 琥珀酸-酒石酸-乙酸钠培养基 :每升含琥珀酸 0.37g ,酒石酸 0.37g ,乙酸

基金项目 :国家 863 计划 (2001AA218041)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-10-62891440 ; E-mail lijilun@cau.edu.cn

作者简介 :李 峰 (1970 -) 男 ,安徽宿州人 ,博士研究生 ,从事微生物遗传学研究。E-mail :ruixuelifeng@tom.com

收稿日期 2004-04-16 ,修回日期 2004-05-11

钠 0.05g、NaNO₃ 0.12g,其它成分见文献[19],pH 6.75。(2)乳酸钠培养基:每升含乳酸钠 2.6g、氯化铵 0.4g、酵母粉 0.1g、K₂HPO₄ 0.5g、MgSO₄·7H₂O 0.1g、硫代乙醇酸钠 0.05g、奎尼酸铁 2mL^[19]、维生素混合液 10mL^[20]、矿质元素混合液 5mL^[20],pH 7.2。此培养基是在文献[2,19]的基础上,经过实验后优化而成的。(3)乳酸钠-谷氨酸钠选择培养基:除去乳酸钠培养基中的氯化铵和酵母粉,加入谷氨酸钠 4g/L,其余成分与乳酸钠培养基同。用于接合试验,大肠杆菌不能利用谷氨酸生长,而趋磁螺菌能在此培养基上生长。

1.1.3 试剂 DIG DNA Labelling & Detection kit 和尼龙膜购自 Boehringer Mannheim 公司;限制性内切酶购自 TaKaRa 公司;溶菌酶购自 Boehringer Mannheim 公司;蛋白酶 K 购自 Merck 公司;抗生素购自华美生物工程公司;磁铁(钕铁硼,12mm×2mm,1200 gauss)购自北京吉华磁性材料厂。

1.2 *M. gryphiswaldense* MSR-1 的固体培养

在含有固体乳酸钠-谷氨酸钠选择培养基的培养皿中接种后,倒置于干燥器中,分别通以 5% O₂、2% O₂、1% O₂、0.5% O₂、纯 N₂,30℃ 培养 3~5d。另一种方式是接种后,立即在培养皿盖和皿底间密封一层石蜡封口膜,倒置,30℃ 培养。

1.3 *M. gryphiswaldense* MSR-1 的抗性检测

在乳酸钠液体培养基中分别加入:金霉素(10μg/mL)、红霉素(25μg/mL)、土霉素(25μg/mL)、链霉素(50μg/mL)、庆大霉素(2.5μg/mL)、氯霉素(12.5μg/mL)、四环素(5μg/mL)、氨基青霉素(50μg/mL)、卡那霉素(2μg/mL),30℃ 培养 3~5d,观察菌生长情况。另外,在乳酸钠液体培养基中分别加入链霉素(300μg/mL)、四环素(5μg/mL),进行抗性突变株的定向培育。

1.4 液体培养磁铁吸附法对磁性细胞直观检测

在 15mL 血清瓶中分别注入不同量(4mL、6mL、8mL、10mL、12mL)的乳酸钠-谷氨酸钠选择培养液,接种后塞上橡胶塞,30℃,150r/min 振荡培养 72h,用磁铁吸附 12h 后,观察。

1.5 接合转座诱变、突变株筛选和电镜鉴定

将含有 pUT mini-Tn5 *lacZ* 2 的 *E. coli* CC118 (λ pir)菌株接种于 LC 培养液中,37℃ 振荡培养过夜。将 *M. gryphiswaldense* MSR-1 接种于乳酸钠培养液中,30℃,150r/min 振荡 72h。取 0.9mL *M. gryphiswaldense* MSR-1 培养物和 0.3mL *E. coli* CC118

(λ pir)培养物加入 1.5mL Eppendorf 管中混匀,离心,弃上清,加入 1mL 乳酸钠-谷氨酸钠选择培养液洗菌泥,离心,弃上清;用 0.05mL 乳酸钠-谷氨酸钠选择培养基重悬菌泥,将混合物涂于滤膜(直径 25mm,孔径 0.22μm)上,置于乳酸钠-谷氨酸钠选择培养基固体平板表面后封膜,30℃ 接合 10h,将滤膜转移到含 0.8mL 乳酸钠-谷氨酸钠选择培养液的试管中,振荡混匀,吸取 50~200μL 涂布在含 5μg/mL 卡那霉素的乳酸钠-谷氨酸钠选择培养基固体平板上,封膜后,30℃ 倒置培养,所得单菌落即为接合子。将在接合固体平板上长出的单菌落,接种于含 8mL 乳酸钠-谷氨酸钠选择培养液的 15mL 具塞小瓶中,30℃,150r/min 振荡培养 120h 后,用磁铁吸附 12h 后观察有无磁性物积累。将无磁性转座突变子与野生株分别接于乳酸钠培养基中,30℃,150r/min 振荡 48h 后。取 1mL 液体培养物,14000r/min 离心 30s 后,用蒸馏水洗 1 次,用铜网蘸菌后,立即再用一滴蒸馏水洗 1 次。醋酸铀染色 3 次,每次 3min,空气干燥后,透射电镜观察有无磁小体,以验证磁小体缺失突变株。

1.6 Southern 杂交

将磁小体缺失突变株及野生株分别接于无铁的乳酸钠培养基中,30℃、150r/min 振荡培养 24h,提取基因组 DNA 的步骤见文献[21]。以 pUT mini-Tn5 *lacZ* 2 上 *Cla*I 片段(约 2.8 kb)为探针与 *Pst*I 酶切的基因组 DNA 片段进行 Southern 杂交,用真空核酸转移系统进行 DNA 转膜。DIG 标记探针的制备、定量、DNA 杂交及检测的具体步骤按照 DIG DNA Labelling & Detection kit 的说明书进行。

2 结果

2.1 *M. gryphiswaldense* MSR-1 的固体平板操作技术的建立

M. gryphiswaldense MSR-1 在乳酸钠-谷氨酸钠选择培养基固体平板上长得较快,琥珀酸-酒石酸-乙酸钠培养基上仅长出少量小菌落。不同氧分压试验结果显示,以通入 2% O₂ 的菌落形成最快,固体平板封膜形成菌落的速度也很快,3~5d 即可形成;0.5% O₂ 条件下生长最慢,通纯 N₂ 的不长。不同氧分压下形成的单菌落颜色差别不明显,几乎不能从颜色上加以区分,没有出现过黑色菌落。*M. gryphiswaldense* MSR-1 在乳酸钠-谷氨酸钠选择培养基固体平板上封膜培养,能快速形成较大的单菌落,而在此培养基上 *E. coli* CC118(λ nir)因缺少可利用的氮

源,不能繁殖和形成菌落。固体乳酸钠-谷氨酸钠选择培养基平板封膜培养技术的建立,是 *M. gryphiswaldense* MSR-1 遗传操作体系中的关键步骤(图 1)。



图 1 *M. gryphiswaldense* MSR-1 在封膜的固体平板上生长情况

Fig.1 *M. gryphiswaldense* MSR-1 grown on plate enveloped with Parafilm

2.2 野生株 *M. gryphiswaldense* MSR-1 对常用 9 种抗生素均无抗性

M. gryphiswaldense MSR-1 对所试 9 种抗生素(金霉素、红霉素、土霉素、链霉素、庆大霉素、氯霉素、四环素、氨苄青霉素、卡那霉素)皆敏感。通过定向培育,获得抗链霉素(300 μ g/mL)、抗四环素(5 μ g/mL)两种抗性突变株,分别命名为 MSR-1 Sm^r和 MSR-1Tc^r。

2.3 *M. gryphiswaldense* MSR-1 突变株液体筛选技术的建立

在 15mL 具塞小瓶中培养 *M. gryphiswaldense* MSR-1 时,以装量 4mL、12mL 乳酸钠-谷氨酸钠选择培养液的细胞磁性最弱,以装量 6mL、10mL 乳酸钠-

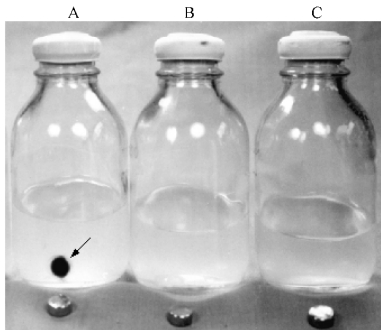


图 2 液体培养磁铁吸附法检测磁性细胞(箭头示磁性细胞聚集物)

Fig.2 Magnetotaxis of *M. gryphiswaldense* MSR-1 detected by magnet adsorption for liquid culture(Arrow show magnetic cell spot)

A : Wild-type ; B : Magnetosome deleted mutant 4 ; C : Magnetosome deleted mutant 21 .

谷氨酸钠选择培养液的细胞磁性较强 ;以装量 8mL 乳酸钠-谷氨酸钠选择培养液的细胞磁性最强 30℃ 培养 5d 后既可用磁铁吸附检测磁性细胞,上述遗传操作体系用于筛选突变子较为直观可靠(图 2)。

2.4 筛选出 2 株磁小体缺失突变株

将含有 pUT mini-Tn5 *lacZ*2 质粒的 *E. coli* CC118 (λ pir) 通过接合转入 *M. gryphiswaldense* MSR-1 中, mini-Tn5 *lacZ*2 随机插入 *M. gryphiswaldense* MSR-1 染色体上进行诱变。mini-Tn5 是 Tn5 的衍生物,mini-Tn5 *lacZ*2 上带有卡那霉素的抗性基因,接合子能在含 5 μ g/mL 卡那霉素的培养基上形成单菌落。对 2000 多株接合子进行液体培养并用磁铁吸附检测,获得 2 株磁小体缺失突变株。电镜观



图 3 野生株 *M. gryphiswaldense* MSR-1 的电镜照片(箭头示磁小体链 40000 \times)

Fig.3 Transmission electron micrograph of wild-type *M. gryphiswaldense* MSR-1(Arrow showing the chain of magnetosome 40000 \times)

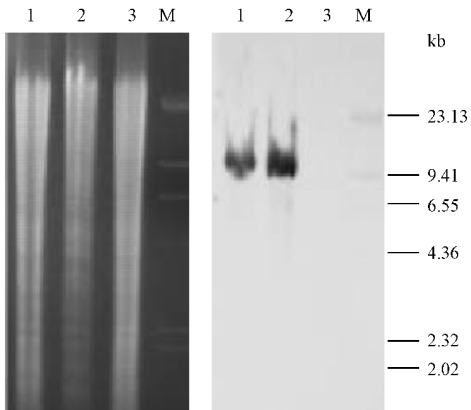


图 4 Southern 杂交结果

Fig.4 Southern hybridization analysis of nonmagnetic mini-Tn5 transposon mutants

Probe was a 2.8kb fragment of mini-Tn5 *lacZ*2 digested with *Cla* I. 1.Genomic DNA from MSR-1 nonmagnetic transconjugant4 digested with *Pst* I ; 2. Genomic DNA from MSR-1 nonmagnetic transconjugant21 digested with *Pst* I 3. Genomic DNA from wild-type MSR-1 digested with *Pst* I ; M. λ DNA/*Hind*III marker.

察野生株含有磁小体链(图 3),磁小体缺失突变株中无磁小体链。以 mini-Tn5 *lacZ2* 的 *Clal* 片段(约 2.8kb)为探针与 *Pst* I 酶切的总 DNA 进行 Southern 杂交验证,磁小体缺失突变确是由 mini-Tn5 插入突变引起的(图 4)。

3 讨论

由于趋磁细菌的遗传操作体系尚不完善,使得在分子水平上研究其遗传学进展缓慢。迄今为止报道的只有 *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1^[20]、*M. gryphiswaldense* MSR-1^[22] 和 *Magnetospirillum* sp. AMB-1^[5] 能在固体平板上形成菌落,但 *M. magnetotacticum* MS-1 难以重复^[5]; *M. gryphiswaldense* MSR-1 所用培养基成分复杂,且培养条件不易操作^[22]; *M. gryphiswaldense* MSR-1 在琥珀酸-酒石酸-乙酸钠培养基上很难形成菌落(见本文 2.1)。本实验建立的固体平板封膜培养法培养 *M. gryphiswaldense* MSR-1 时,无需换气,仅以固体平板封膜即可,菌落长得快且大,操作方便快捷。Schültheiss 等^[22] 和 Matsunaga 等^[5] 曾分别报道 *M. gryphiswaldense* MSR-1 和 *Magnetospirillum* sp. AMB-1 在固体培养基上能形成黑色菌落,但在我们的试验条件下,尚未见到黑色菌落(见本文 2.1)。*M. gryphiswaldense* MSR-1 为微好氧菌,氧分压对其生长和合成磁小体影响很大。在相同体积的具塞血清瓶中加入不同体积的培养液,液面上气相初始氧分压相同,但氧含量不同,接种后随着细菌的生长繁殖消耗氧,瓶中会形成不同的氧分压,而加入血清瓶容积一半的培养液,接种后 *M. gryphiswaldense* MSR-1 的生长繁殖消耗氧所形成的氧分压适合其生长和合成磁小体。为此我们所建立的在 15mL 具塞血清瓶中加入 8mL 培养液,经接种培养后,以钕铁硼小磁铁吸附磁性细胞的技术,用于筛选磁小体缺失突变株更为直观可靠(见本文 2.3)。但也存在着用乳酸钠-谷氨酸钠选择性培养基不能清除大肠杆菌的弊端,对所获得的突变株仍需进一步分离纯化,才能得到纯的突变株。在缺少 *M. gryphiswaldense* MSR-1 抗性菌株的情况下,我们用上述体系获得了 2 个磁小体缺失突变株。同时,针对利用乳酸钠-谷氨酸钠选择性培养基带来的弊端,我们采用常规的定向培育技术,已分别获得了抗链霉素(200μg/mL)和抗四环素(5μg/mL)的 2 个抗性突变株,它们的抗性稳定,趋磁性未变,而 *E. coli* CC118(*λpir*)对链霉素和四环素敏感,故可利用抗性选择标记代替乳酸钠-谷氨酸钠选择性培养基,可更

简便地筛选出趋磁螺菌(*M. gryphiswaldense* MSR-1)的各种突变株。

参 考 文 献

- [1] Blakemore R P. Magnetotactic bacteria. *Science*, 1975, **190**: 377 – 379.
- [2] Schleifer K H, Schuler D, Spring S, et al. The genus *Magnetospirillum* gen. nov. description of *Magnetospirillum gryphiswaldense* sp. nov. and transfer of *Aquaspirillum magneticum* to *Magnetospirillum magneticum* comb. nov.. *System Appl Microbiol*, 1991, **14**: 379 – 385.
- [3] Schuler D, Spring S, Bazylinski D A. Improved technique for the isolation of magnetotactic spirilla from a freshwater sediment and their phylogenetic characterization. *System Appl Microbiol*, 1999, **22**: 2466 – 471.
- [4] Yamazaki T, Oyanagi H, Fujiwara T, et al. Nitrite reductase from the magnetotactic bacterium *Magnetospirillum magneticum*; a novel cytochrome *cd₁* with Fe(II):nitrite oxidoreductase activity. *Eur J Biochem*, 1995, **233**: 665 – 671.
- [5] Matsunaga T, Nakamura C, Burgess J G, et al. Gene transfer in magnetic bacteria: transposon mutagenesis and cloning of genomic DNA fragments required for magnetosome synthesis. *J Bacteriol*, 1992, **174**: 2748 – 2753.
- [6] Gorby Y A, Beveridge T J, Blakemore R P. Characterization of the bacterial magnetosome membrane. *J Bacteriol*, 1988, **170**: 834 – 841.
- [7] Kirschvink J L, Lowenstam H A. Mineralization of chiton teeth: paleomagnetic, sedimentologic, and biologic implications of organic magnetite. *Earth Plan Sci Lett*, 1978, **44**: 193 – 204.
- [8] Gould J L, Kirschvink J L, Deffeyes K S. Bees have magnetic remanence. *Science*, 1978, **201**: 1026 – 1028.
- [9] Walcott C, Gould J L, Kirschvink J L. Pigeons have magnets. *Science*, 1979, **205**: 1027 – 1029.
- [10] Torres de Araujo F F, Pires M A, Frankel R B, et al. Magnetite and magnetotaxis in algae. *Biophys J*, 1986, **50**: 375 – 378.
- [11] Kirschvink S. Magnetoreception: Homing in on vertebrates. *Nature*, 1997, **390**: 339 – 340.
- [12] Kirschvink J L, Kobayashi-Kirschvink A, Woodford B J. Magnetite biomineralization in the human brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 7683 – 7687.
- [13] Buseck P R, Dunin-Borkowski R E, Devouard B, et al. Magnetite morphology and life on Mars. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 13490 – 13495.
- [14] Farina M, Esquivel D M S, Lins de Barros H G P. Magnetic iron-sulphur crystals from a magnetotactic microorganism. *Nature*, 1990, **343**: 256 – 258.
- [15] Mann S, Sparks N H C, Frankel R B. Biomineralization of ferromagnetic greigite (Fe₃S₄) and iron pyrite (FeS₂) in a magnetotactic bacterium. *Nature*, 1990, **343**: 258 – 261.
- [16] Tanaka T, Matsunaga T. Fully automated chemiluminescence immunoassay of insulin using antibody-protein A-bacterial magnetic particle complexes. *Anal Chem*, 2000, **72**: 3518 – 3522.

- [17] Nakamura N , Matsunaga T. Highly sensitive detection of allergen using bacterial magnetic particles. *Anal Chim Acta* ,1993 **281** :585 – 589.
- [18] 龚连生,张阳德,周少波. 磁性化疗纳米粒治疗大鼠移植性肝癌. 中国现代医学杂志 2001 **11** :14 – 16.
- [19] Blakemore R P , Maratea D , Wolfe R S. Isolation and pure culture of a freshwater magnetic spirillum in chemically defined medium. *J Bacteriol* ,1979 **140** :720 – 729.
- [20] Wolin E A , Wolin M J , Wolfe R S. Formation of methane by bacterial extracts. *J Biol Chem* ,1963 **238** :2882 – 2886.
- [21] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. Molecular Cloning :A Laboratory Manual. 2nd ed. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989.
- [22] Schültheiss D , Schüler D. Development of a genetic system for *Magnetospirillum gryphiswaldense* . *Arch Microbiol* ,2003 **179** :89 – 94.

Development of A Genetic Manipulation System and Screening of Magnetosome Deleted Mutants for *Magnetospirillum gryphiswaldense*

LI Feng LI Ying JIANG Wei WANG Zhen-Fang LI Ji-Lun*

(College of Biological Sciences , China Agricultural University , Beijing 100094 , China)

Abstract : Progress in the genetic analysis of the mechanism of magnetosome biosynthesis in *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 has been hampered by the lack of an appropriate genetic manipulation system and its antibiotic-resistant mutants. Here reported on the establishment of a genetic manipulation system that can be used more readily than that of the others for *Magnetospirillum* . This system included method of solid medium plate enveloped with Parafilm to form colony , conjugational gene transfer in a selective medium , screening the nonmagnetic mutants by magnet adsorption technique. Two magnetosome deleted mutants were constructed by conjugative transposon mutagenesis and the application of this genetic system. This system and the two nonmagnetic mutants will be very useful in study of the molecular mechanism of magnetosome biosynthesis in magnetotactic bacteria.

Key words : *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 , Magnetosome deleted mutants , Mini-Tn5 *lacZ2* , Conjugative transposon mutagenesis

Foundation item : Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2001AA218041)

* Corresponding author. Tel/Fax 86-10-62891440 ; E-mail : lijilun@cau.edu.cn

Received date 04-16-2004

写 作 要 点

凡投送本刊的稿件,如涉及到以下内容,请作者按照本刊要求撰写。

1. 摘要 :中英文摘要均采用第三人称叙述,不允许出现第一人称,如“本文、本研究、我们……”等。研究论文摘要包括目的、方法、结果和讨论,综述摘要包括论述内容的发展水平、自己的评论和展望。英文摘要中也可以加入自己的一些观点,用过去时态叙述作者工作,用现在时态叙述作者结论。要求语法正确,句子通顺,最好请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再投来。

2. 系统发育树 :系统树中菌名应列出全称及菌株号,名字后加括号,其内含序列号,图注应说明“树”上所有的内容,包括:括号中的序列号、分支点上的数字涵义、比例尺代表的意义(如 0.01)。[参见:微生物学报,2004,44(2):143.]

3. 测序结果 :因本刊版面紧张,所有测序结果(核酸、蛋白质),请作者先通过计算机网络进入国际基因库 EMBI(欧洲)或 GenBank(美国)或 DDBJ(日本),申请得到国际基因库接受号(Accession No.)后再投稿。

《微生物学报》编辑部