

呋喃丹降解菌 CDS-1 的双标记菌株的构建

徐剑宏 武俊洪 青张志琳 李顺鹏*

(南京农业大学生命科学院 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

摘 要 :用 *Sau3AI* 消化呋喃丹降解菌 *Sphingomonas* sp. CDS-1 的基因组 DNA,将所得 DNA 片段与 *Bam*H I 酶切的启动子探针载体 pRobe-GFP 酶连后转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,在选择性平板上培养,从大约 1×10^4 个菌落中筛选到 50 个含启动子片段的阳性克隆。挑选其中一个发光强度最强的阳性克隆 F7,将它的重组质粒 pF7 用 *Eco*R I 和 *Hind*III 双酶切后得到包含 *Sphingomonas* sp. CDS-1 启动子和 *gfp* 基因的 DNA 片段,将该片段克隆到广宿主载体 pPZP201 上,得到 pPZP201-*gfp* 质粒。将 pPZP201-*gfp* 通过三亲接合转移至 *Sphingomonas* sp. CDS-1 中得到 GFP 标记菌株 CDS-*gfp*。经荧光显微镜观察,*gfp* 基因在 CDS-*gfp* 中表达量很高。对标记菌株进行连续传代 10 次(48h/次)发现 pPZP201-*gfp* 依然存在,而且发光明显。通过 *Not* I 酶切位点把 *linA* 基因连接到 pUT/mini-Tn5 上构建新的转座子载体 pUT/mini-Tn5-*linA*。以 pRK600 为辅助质粒将 pUT/mini-Tn5-*linA* 引入到 CDS-1 中,*linA* 基因通过转座作用,插入到 CDS-*gfp* 的染色体中,得到双标记菌株 CDS-GFP-*LinA*。该菌株是一株能同时降解 γ -六六六和呋喃丹的基因工程菌。本研究的结果为研究 *Sphingomonas* sp. CDS-1 的生态学行为奠定了基础。

关键词 :*Sphingomonas* sp. CDS-1 呋喃丹 降解 双标记 基因工程菌

中图分类号 :Q78 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2006)04-0613-05

利用农药残留高效降解菌来处理污染环境中的农药残留是生物修复的一种有效方法,然而对于被接入的外源微生物在污染环境中的生态优势,生存状况及发挥的功能等信息并不容易获得,这就要求应用现代生物技术去研究和发现。通过对菌株进行发光标记,跟踪接种微生物在新环境中生物特征,是一个很有用的研究手段^[1]。目前常用的标记手段有天然抗生素抗性标记^[2],荧光酶基因标记(*lux*)^[3], β -葡萄糖苷酸酶基因标记(*gus*)^[4],冰核基因标记(*inaZ*)^[5],绿色荧光蛋白基因标记(*gfp*)^[6]。在这些标记基因中绿色荧光蛋白基因的应用最为广泛。因为它具备如下优点:检测方便、荧光稳定、无毒害、密码子具有通用性、和可进行活细胞定时原位观察^[7]。

本实验室在以前的研究工作中已经成功构建了带有 *gfp* 的广宿主载体 pTRGFP 和 pBBRGFP,并对有机磷降解菌 *Pseudomonas putida* DLL-1 进行了标记和生态学行为研究^[8]。但是这两个标记载体所带的 *gfp* 基因在呋喃丹降解菌 *Sphingomonas* sp. CDS-1 中

表达很弱,几乎检测不到荧光。分析原因,虽然绿色荧光蛋白基因的密码子具有通用性,但是它在某个具体菌株中的表达情况还受到该基因上游启动子的调控。本研究用 *gfp* 为报告基因的探针,构建 *Sphingomonas* sp. CDS-1 的启动子文库,从中筛选出强启动子,以该启动子为基础构建进行标记的载体,进而标记该菌株。尽管 GFP 标记具有很多优点,但是它也存在受外界环境能自身产生荧光菌的影响,如荧光假单胞菌等;而且 *gfp* 基因是通过构建在广宿主质粒上,再结合到受体菌中的,由于质粒本身有不稳定的一面,它可以在菌株间转移,这也会对结果造成一定的偏差。为了更准确地了解接种微生物的生态行为,有必要对其进行双重标记。本研究通过把 *linA*^[9] 构建到转座子上,通过转座子再把 *linA* 基因插入到已经标记上 *gfp* 的 CDS-*gfp* 的染色体 DNA 中,这样一来,就构建了双标记菌株 CDS-GFP-*LinA*,该标记菌株同时又是一株很好的多功能农药残留降解菌,它不但能够降解呋喃丹,又可以对六六六进行脱氯,生成较容易降解的 1,2,4-三氯苯^[10],有利于

基金项目 :国家自然科学基金(30400013) ;江苏省科技厅项目(BE2002345, BE2003343, BC2005322)

* 通讯作者。 Tel/Fax 86-25-84396314, E-mail :jsp@njau.edu.cn

作者简介 :徐剑宏(1974-),女,江苏海门人,博士研究生,主要从事环境微生物学和分子生物学研究。 E-mail :jhxx2000cn@yahoo.com.cn

其他作者 :王云端

收稿日期 :2005-09-12;接受日期 :2005-10-09;修回日期 :2005-11-12

其被土壤微生物进一步降解^[11]。通过构建这样的双标记菌株,为以后研究 *Sphingomonas* sp. CDS-1 的生态行为奠定基础,同时还将为标记鞘氨醇单胞属的其它菌株提供材料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 本试验所用菌株和质粒见表 1。

表 1 本研究中所用的菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Characteristics	Reference or source
Bacterial strains		
<i>Sphingomonas</i> sp. CDS-1	Amp ^r Str ^r , carbofuran-degrading strain	This laboratory ^[12]
<i>Sphingomonas</i> sp. BHC-A	Amp ^r Str ^r , γ -hexachlorocyclohexane-degrading strain	This laboratory ^[9]
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>Escherichia coli</i> supE44 hsdR17 Δ lacU169, reaA1 ϕ endA1 ϕ gryA96 ϕ thi-1 relA1	This laboratory
<i>E. coli</i> SM10 (λ pir)	<i>thi thr len tonA loy su10pE recA</i> : :RP4-2Tc : :Mu λ π R6K	Reference ^[13]
Plasmids		
pRobe-GFP	Amp ^r pUC19 vector with 770 bp foreign fragment including <i>gfp</i>	This laboratory
pPZP201	Spe ^r , broad host vector	This laboratory
pPZP201- <i>gfp</i>	Spe ^r pPZP201 vector with 2kb foreign fragmen	This work
pRK2013	mob ⁺ tra ⁺ km ^r , Triparental conjugation helper	This laboratory
pUT/mini-Tn5	Derivative of Tn5 Km ^r Amp ^r oriR6K	Reference ^[14]
pRK600	Cm ^r , Triparental conjugation helper	Reference ^[14]
pUT/mini-Tn5- <i>linA</i>	pUT/mini-Tn5 (Km ^r) carrying 874 bp <i>linA</i> gene	This work

1.1.2 培养基 无机盐培养基(MM):NH₄NO₃ 1.0g, KH₂PO₄ 0.5g, K₂HPO₄ 1.5g, NaCl 0.5g, MgSO₄ 0.1g, pH 7.2, 去离子水 1000mL, LB 培养基^[13]。

1.1.3 抗生素及使用浓度:氨苄青霉素(Amp)为 100 μ g/mL,链霉素(Str)为 50 μ g/mL,卡那霉素(Km)为 100 μ g/mL,壮观霉素(Spe)为 100 μ g/mL,氯霉素(Cm)为 10 μ g/mL。

1.1.4 试剂和酶:限制性内切酶、碱性磷酸酶、T4 DNA 连接酶等购自 TaKaRa Biotechnology 公司。

1.2 DNA 的分子操作

CDS-1 总 DNA 的提取、质粒提取、酶切、去磷酸化、酶连和转化等分子操作参照文献[12]进行。克隆片段的测序由上海博亚公司完成。

1.3 启动子文库的构建策略

提取质粒 pRobe-GFP,用 BamH I 完全酶切,并用 CIAP 脱磷酸化后与用 Sau3A I 不完全酶切 CDS-1 染色体 DNA 所得片段(小于 1kb)酶连,把酶连产物转化至 *E. coli* DH5 α 中,涂布于含 Amp 的 LB 平板 37 $^{\circ}$ C 过夜培养,放置 4 $^{\circ}$ C,挑取发出绿色荧光的菌落即为带有启动子片段的阳性克隆。

1.4 三亲接合

参照文献[15]进行,将三亲本分别接入加有相应抗生素的 LB 液体培养基中培养,取培养好的 3 种菌液(供体菌,辅助菌,受体菌)各 3mL,10000r/min 离心并用 LB 培养基洗涤,把洗涤后的 3 种菌液混在一起,在 LB 固体平板上放上一张灭过菌的细菌滤

膜(孔径 0.45 μ m),把混合菌体滴在滤膜上,30 $^{\circ}$ C 培养过夜,用 LB 液体把菌体洗下,取适量涂布于含有相应抗生素的平板上,筛选接合子。

1.5 呋喃丹含量的检测

在液体 LB 中培养 CDS-1,取处于对数生长后期的菌液,10000r/min 离心 5min,弃上清液,加入等体积的 pH7.0 的磷酸盐缓冲液,按 5% 的接种量加入到含 100 μ g/mL 呋喃丹的 MM 中,30 $^{\circ}$ C、150r/min 培养 48h,取样 1mL,加入 5mL 的二氯甲烷,剧烈震荡 5min,静置分层,弃上清,过无水硫酸钠柱,在 UV-PC401 型分光光度计上进行检测,根据呋喃丹在 283nm 处特征吸收峰的峰值来计算呋喃丹的含量。

1.6 六六六含量的检测

在液体 LB 中培养 CDS-1,取处于对数生长后期的菌液,10000r/min 离心 5min,弃上清液,加入等体积 pH7.0 的磷酸盐缓冲液,按 5% 的接种量加入到含 50 μ g/mL 六六六的 20mL MM 中,30 $^{\circ}$ C、150 r/min 培养 48h,培养液用 100mL 正己烷剧烈震荡 5min,静置分层后,吸上清,过无水硫酸钠柱,稀释至适当浓度,上气相色谱进行检测,测定条件见文献[16]。

1.7 菌体的荧光检测

菌株的发光情况用 Leica Microsystem 的荧光显微镜检测。

2 结果

2.1 启动子的获得

从大约 1×10^4 个菌落中获得了 50 个发绿光的

阳性克隆, 提取部分克隆中的重组质粒用 *Eco*R I 和 *Hind* III 进行双酶切, 发现阳性克隆的酶切片段都要比 pRobe-GFP 的酶切片段(第 16 泳道)大, 表明重组质粒中都有外源片段插入(图 1)。这也说明成功获得了能够使 *gfp* 基因组成表达的启动子。

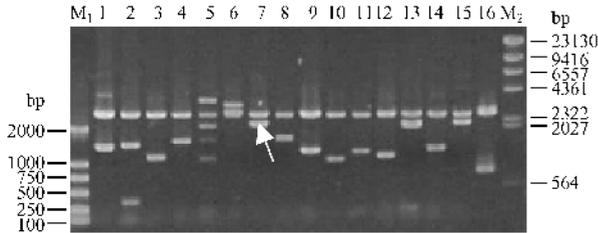


图 1 阳性克隆中质粒的酶切分析

Fig. 1 Restriction analysis of plasmids from positive clones. M₁: DL2000 DNA marker; 1 ~ 15. Plasmids/*Eco*R I & *Hind* III; 16. pRobe-GFP/*Eco*R I & *Hind* III; M₂: λDNA/*Hind* III Marker.

2.2 启动子片段测序分析

根据上面的酶切分析, 挑取发绿色荧光较强, 外源片段中没有 *Eco*R I 和 *Hind* III 的酶切位点, 编号为 F7 的阳性克隆(图 1 中第 7 泳道), 对其质粒 pF7 中的插入片段进行测序, 结果表明 1154bp 的启动子片段内部含有两个启动子, 两个启动子的 Pribnow 框和 Sextama 框的距离都为 17bp, 为典型的启动子结构。

2.3 标记载体 pPZP201-*gfp* 的构建

由于常规的载体只能在大肠杆菌中稳定表达, 因此构建用于检测的含有标记基因的载体必须选择合适的出发质粒, 以便使构建的载体能广泛转移到更多降解菌中并在其中高效表达。pPZP201 是一个稳定的广宿主质粒, 可以在多个属的革兰氏阴性菌中稳定遗传, 有助于对宿主菌跟踪检验。用 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切 pF7, 回收包括 *gfp* 和 CDS-1 启动子的 DNA 片段(2kb 左右)和经过同样酶切的 pPZP201 酶连, 转化至 *E. coli* DH5α 中, 在含 50 μg/mL 壮观霉素的 LB 平板上涂布, 37°C 培养, 挑取发荧光的菌, 提取质粒 pPZP201-*gfp*, 用 *Eco*R I、*Hind* III 双酶切验证(图 1), 结果表明 pF7 切下的包括 *gfp* 和 CDS-1 启动子的 DNA 片段已连接到 pPZP201 质粒上, 从而成功构建了重组质粒 pPZP201-*gfp*。

2.4 用 pPZP201-*gfp* 对呋喃丹降解菌 CDS-1 进行 GFP 标记

以 *E. coli* DH5α (pPZP201-*gfp*) 作为供体菌, *E. coli* DH5α (pRK2013) 作为辅助菌, CDS-1 作为受体菌进行三亲结合, 涂布于含 50 μg/mL 壮观霉素, 氨苄青霉素, 链霉素的 LB 平板上, 30°C 培养, 在紫外灯下挑

选出绿色荧光的菌, 并提取这些菌的质粒, 电泳结果表明和 CDS-1 的质粒图谱相比, 在发出荧光菌的质粒中多了一条带, 并且和 pPZP201-*gfp* 大小一致, 这就表明 CDS-1 中转入 pPZP201-*gfp* 后, 成功地使 *gfp* 基因在 CDS-1 中得到了表达。为此获得了 GFP 标记的 CDS-1, 命名为 CDS-*gfp*。

2.5 pUT/mini-Tn5-*linA* 的构建

从 *Sphingomonas* sp. BHC-A 扩增 *linA* 基因和启动子部分(引物设计中加入 *Not* I 酶切位点), 用 *Not* I 酶切 pUT/mini-Tn5 并进行脱磷酸化处理, 把 *linA* 和 pUT/mini-Tn5/*Not* I 进行酶连, 转化至 *E. coli* SM10 (λpir) 感受态细胞中, 涂布在含有 Km、Amp 和六六六的 LB 平板上, 37°C 过夜培养, 筛选阳性克隆 *E. coli* pUT/mini-Tn5-*linA*, 对阳性克隆进行六六六降解功能的检测, 结果表明 *E. coli* DH5α pUT/mini-Tn5-*linA* 具有降解六六六的功能, 说明 *linA* 基因已被成功插入到 pUT/mini-Tn5 中了。

2.6 双标记菌株 CDS-GFP-*LinA* 的获得

以 *E. coli* DH5α pUT/mini-Tn5-*linA* 作为供体菌, *E. coli* DH5α/pRK600 作为辅助菌, CDS-*gfp* 作为受体菌进行三亲接合, 涂布于含卡那霉素、壮观霉素、氨苄青霉素和链霉素的 LB 平板上, 30°C 培养, 待菌长出后, 挑接合子培养后提取总 DNA, 以总 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增来检测 *linA* 基因的插入情况, 结果显示以接合子的总 DNA 为模板扩增出了和 *linA* 基因插入片段相同大小的片段, 这就表明 *linA* 基因已经插入到了 CDS-*gfp* 中。同时对接合子进行六六六降解能力的检测(图 2), 气相色谱检测表明经过 CDS-1 处理, 六六六的特征峰($T = 0.840$)没有改变, 而在相同的条件下经过 CDS-GFP-*LinA* 的处理, 特征峰几乎没有了, 这就表明双标记菌株 CDS-GFP-*LinA* 已经具有了降解六六六的能力, 六六六的降解功能

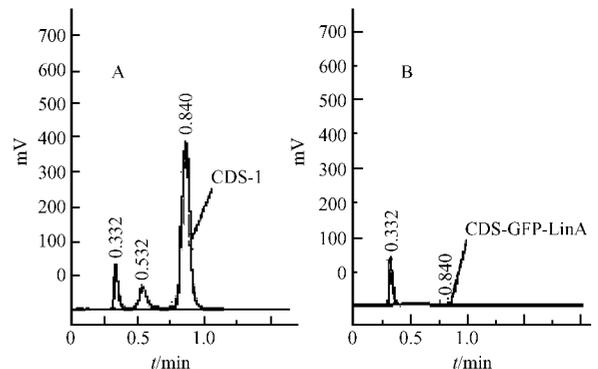


图 2 CDS-GFP-*LinA* 对六六六的降解

Fig. 2 The degradation of γ -HCH by CDS-GFP-*LinA*.

也可在含有六六六的农药平板上通过观察农药被利用后产生的透明圈而方便地被检测出来。在荧光显微镜下观察到 CDS-GFP-*LinA* 能发出明显的荧光(图 3)这就表明能同时表达 *gfp* 和 *linA* 的双标记菌株已成功构建。

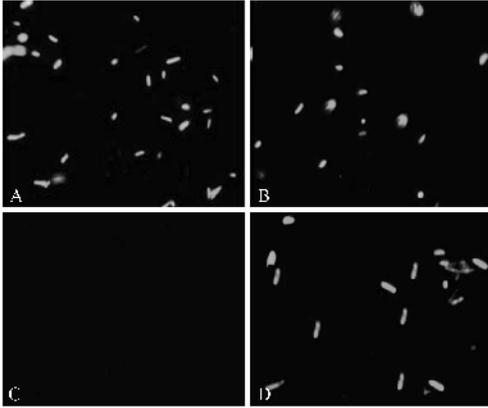


图 3 菌体的荧光显微照片(1000×)

Fig.3 Fluorescent photograph of bacterium(1000×). A. F7; B. *E. coli* DH5α (pPZP201-*gfp*); C. CDS-1; D. CDS-GFP-*LinA*.

2.7 CDS-1 和 CDS-GFP-*LinA* 性状比较

把 CDS-1 和 CDS-GFP-*LinA* 接入 LB 培养基中, 30℃、150r/min 培养 48h, CDS-1 的 $OD_{600} = 1.68$, CDS-GFP-*LinA* 的 $OD_{600} = 1.72$, 证明了 *gfp* 和 *linA* 基因的导入不影响 CDS-1 的生长。把 CDS-GFP-*LinA* 在 LB 培养基中传代 100 代, 检测其对呋喃丹的降解(图 4)结果显示, CDS-GFP-*LinA* 对呋喃丹的降解能力和 CDS-1 没有显著差别, *LinA* 基因和 *gfp* 基因的引入并没有影响它对呋喃丹的降解。

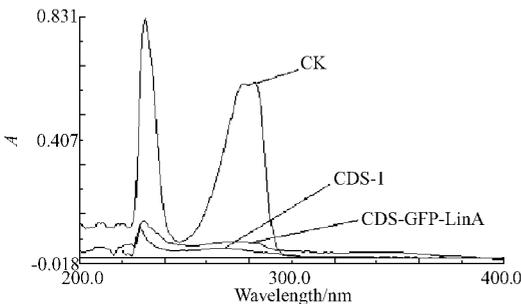


图 4 呋喃丹降解的紫外扫描图

Fig.4 Result of degradation of carbofuran by CDS-1 and CDS-GFP-*LinA* (tested by UV scan).

3 结论

本研究从 CDS-1 的基因组 DNA 中获得了一个带有 2 个典型启动子的 DNA 片段, 该片段和 GFP 探针一起构建了组成型表达 *gfp* 基因。为了能够使构建好的组成型表达 *gfp* 基因在 CDS-1 中稳定高效表

达, 把带有启动子的 *gfp* 基因连接到广宿主载体 pPZP201 上, 通过三亲接合的方法把构建好的广宿主载体转入到受体菌 CDS-1, 从而完成了 CDS-1 的 *gfp* 标记。通过转座子再把 *linA* 基因插入到已经标记上 *gfp* 的 CDS-*gfp* 染色体 DNA 中。CDS-GFP-*LinA* 不仅是一株双标记菌株, 可以用它方便、准确地研究降解菌的环境生态行为, 同时它又是一株能够高效降解呋喃丹和六六六的多功能农药残留降解菌。所以该菌株不但可用于后续的环境生态研究, 也可作为一株基因工程菌用于消除环境中呋喃丹和六六六的农药残留。

参 考 文 献

- [1] 田 涛, 王 琦. 绿色荧光蛋白作为分子标记物在微生物学中的应用. 微生物学杂志, 2004, 25(1): 68-73.
- [2] Glandorf DCM, Brand I, Bakker PAHM, et al. Stability of rifampicin resistance as a marker for root colonization studies of *Pseudomonas putida* in the field. *Plant Soil*, 1992, 147: 135-142.
- [3] 王 平. 发光酶基因标记的荧光假单胞菌在 X16L2 在小麦根圈的定殖动态. 微生物学报, 2000, 40(2): 150-154.
- [4] 王忠华. 转基因植物中报告基因 *gus* 的表达及其安全性评价. 生命科学, 2000, 12(2): 207-209.
- [5] 刘招舰. 一种新型的报告基因-冰核基因. 生命的化学, 2001, 21(5): 395-396.
- [6] Misteli T. Application of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nature Biotechnology*, 1997, 15: 961-963.
- [7] 宫 明. 报告基因. 生命的化学, 2000, 20(3): 126-127.
- [8] 邱珊莲, 崔中利, 李顺鹏, 等. 甲基对硫磷降解菌 DLLBR 在青菜及根际土壤中的定植研究. 土壤, 2005, 37(1): 100-104.
- [9] 马爱芝, 武 俊, 李顺鹏, 等. 六六六(HCH)降解菌 *Sphingomonas* sp. BHC-A 的分离与降解特性研究. 微生物学报, 2005, 45(5): 728-732.
- [10] Trantirek L, Hynkova K, Nagata Y, et al. Reaction mechanism and stereochemistry of γ -hexachlorocyclohexane dehydrochlorinase *LinA*. *J Biol Chem*, 2001, 276: 7734-7740.
- [11] 何耀武, 孙铁珩, 区自清. 1, 2, 4-三氯苯在土壤中的降解. 应用生态学报, 1996, 7(4): 429-434.
- [12] 徐剑宏, 洪 青, 李顺鹏, 等. 转座子标签法突变呋喃丹降解菌 CDS-1. 微生物学通报, 2005, 32(2): 34-38.
- [13] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989.
- [14] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16: 1215.
- [15] 马雪梅, 高 东, 皱 文. 转座子 Tn916 结合转移诱变棒杆菌. 微生物学通报, 1994, 21(4): 244-247.
- [16] Imai R, Nagata Y, Fukuda M, et al. Molecular cloning of a *Pseudomonas paucimobilis* gene encoding a 17-kilodalton polypeptide that eliminates HCl molecules from γ -hexachlorocyclohexane. *J Bacteriol*, 1991, 173: 6811-6819.

Construction of double-labelled carbofuran-degrading bacterium *Sphingomonas* sp. CDS-1

XU Jian-hong , WU Jun , HONG Qing , ZHANG Zhi-lin , LI Shun-peng*

(Key Laboratory of Agricultural Environment Microbiological Engineering , Ministry of Agriculture ,
College of Life Sciences , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China)

Abstract :The genomic DNA of a carbofuran-degrading bacterium *Sphingomonas* sp. CDS-1 was digested by *Sau3AI* and ligated to pRbe-GFP digested by *BamHI* , and the product was transformed to the *E. coli* DH5 α competent cells. Fifty positive clones that could emit green fluorescence under UV were selected from about 1×10^4 clones grown on selective plates AmpLB. One clone F7 with the strongest fluorescence was selected , the recombinant plasmid pF7 from this clone was digested with *EcoRI* & *HindIII* and the DNA fragment comprising *gfp* and promoter of *Sphingomonas* sp. CDS-1 was recovered , which was subsequently cloned into the broad host vector pPZP201 to construct a new plasmid pPZP201-*gfp*. pPZP201-*gfp* was introduced into *Sphingomonas* sp. strain CDS-1 by triparental conjugation to make strain CDS-*gfp*. *gfp* was expressed strongly and stably in strain CDS-*gfp* after 10 times successive re-culturing (48h/time). The *linA* gene was inserted into *NotI* -cut transposon vector pUT/mini-Tn5 to construct a new transposon vector pUT/mini-Tn5-*linA*. With the aid of helper plasmid pRK600 , pUT/mini-Tn5-*linA* was introduced into CDS-*gfp* , the dehydrochlorinase gene *linA* was integrated into the chromosome of CDS-*gfp* by transposing. The double labelled strain CDS-GFP-LinA was constructed. This strain was also a genetic engineering strain that was able to degrade γ -hexachlorocyclohexane and carbofuran simultaneously. All of these results laid a foundation for the study of ecological performance of *Sphingomonas* sp. CDS-1.

Keywords : *Sphingomonas* sp. CDS-1 ; Carbofuran ; Degradation ; Double-labelled ; Genetic engineering strain

Foundation item : Chinese National Natural Science Fund(30400013) ; The Project for the Science and Technology of Jiangsu Province (BE2002345 , BE2003343 , BG2005322)

* Corresponding author. Tel/Fax :86-25-84396314 ;E-mail :sp@njau.edu.cn

Other author : WANG Yun-duan

Received :12 September 2005/Accepted 9 October 2005/Revised :12 November 2005