

# PNP 降解相关基因温敏突变株的分离及其特性研究\*

邓海华 李晓丹 曹 慧 王世明 黄婷婷 崔中利\*\*

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

**摘要:** 通过接合转移将质粒 pSC123 上的转座子 Tn5 随机插入到 DLL-E4 基因组 DNA 中, 从大约 8,000 个突变株中得到 1 株温度敏感型突变株 MT54。根据转座子上的已知序列设计引物以 MT54 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 证实 MT54 的染色体中有转座子插入。MT54 在 30℃ 条件下能够以对硝基苯酚 (*p*-nitrophenol, PNP) 为唯一碳源生长, 但在 37℃ 不能生长。格里斯试剂法检测  $\text{NO}_2^-$  的生成情况进一步证明了 MT54 的这种特性。通过 30℃ 和 37℃ 两种温度条件下 MT54 和原始出发菌株 DLL-E4 对 PNP 和对苯二酚降解情况的比较, 推测温敏突变位点可能发生在与 PNP 降解相关的基因中。

**关键词:** 对硝基苯酚, 对苯二酚, 转座子突变, 温敏突变株

**中图分类号:** Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0032-04

## Isolation and Characterization of a Temperature-sensitive *p*-Nitrophenol Degradation Related Genes Mutant Strain

DENG Hai-Hua LI Xiao-Dan CAO Hui WANG Shi-Ming HUANG Ting-Ting CUI Zhong-Li\*\*

(Key Lab of Microbiology Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

**Abstract:** A temperature-sensitive mutant strain was isolated after transposon mutagenesis with Tn5 and named MT54. PCR was carried out with primers designed according to the sequence of transposon, the PCR products showed that the MT54 carried transposon in the genome. The mutant grew well at 30℃ in minimal medium (MM) containing *p*-nitrophenol (PNP) as sole carbon source, while it cannot grow at 37℃ in the same medium,  $\text{NO}_2^-$  detection results also proved that. Comparing the degradation rate of PNP and hydroquinone of MT54 and DLL-E4 at different temperature, it was speculated that the mutant site locate in the PNP degradation related genes.

**Key words:** *p*-Nitrophenol, Hydroquinone, Transposon insertion mutant, Temperature-sensitive mutant

对硝基苯酚 (PNP) 是化工、医药和印染等行业的重要原料之一, 也是一类较为普遍的环境污染物, 被美国国家环保总局 (U. S. Environmental Protection Agency, EPA) 列为优先控制污染物<sup>[1-3]</sup>。尽管日前发现能降解利用 PNP 的微生物种类已有十多个种属, 并且还在不断地扩大, 但是它们降解利用 PNP 的途径并未完全确定<sup>[4-6]</sup>。微生物降解 PNP 有两种主要途径, 即对苯二酚途径 (hydroquinone pathway) 和偏苯三酚途径 (hydroxyquinol pathway)<sup>[7]</sup>。对苯二酚途径主要存在于革兰氏阴性菌, 在这种途径中 PNP 先脱硝基

生成对苯二酚, 然后在对苯二酚 1, 2-双加氧酶的作用下裂解开环。

转座子标签 (transposon tagging) 法是克隆未知基因的一种常见方法, 转座子随机插入染色体或质粒 DNA 中, 导致插入位点处基因发生突变<sup>[8]</sup>。通过筛选功能发生变化的突变株, 来研究突变株中被插入的基因的功能<sup>[9-11]</sup>。目前许多环境污染物的降解基因都是通过突变的方法进行克隆的, 但还没有降解基因温度敏感型突变体的报道。温敏突变株一般是通过物理化学法随机诱变和 PCR 随机位点突变获得的<sup>[12]</sup>, 温敏突变体的获

\* 国家高技术研究发展计划项目 (“863”项目) (No. 2004AA246070)

国家自然科学基金资助项目 (No. 30300005, 40371069)

\*\* 通讯作者 E-mail: cai@njau.edu.cn

收稿日期: 2006-03-09, 修回日期: 2006-04-20

得为研究功能基因提供了很好的材料。本文利用 Tn5 转座子诱变法筛选获得了 PNP 降解相关基因的温敏突变株并研究了其对 PNP 和对苯二酚的降解特性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 质粒及菌种

*Pseudomonas putida* DLL-E4 (Ap<sup>r</sup>), 为革兰氏阴性菌, 带有一个大于 23kb 的质粒, 由本实验室刘智博士从长期施用甲基对硫磷的污染土壤中分离得到, 能够以 PNP 为唯一碳源生长<sup>[13,14]</sup>。

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pSC123, 含 Tn5 转座子) (Km<sup>r</sup>, Cm<sup>r</sup>), 为本实验室保存。

### 1.2 试剂和培养基

基础盐培养基(MM): NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1.0g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5g, NaCl 0.5g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2g, pH 7.2, 去离子水定容至 1,000 mL; 含对 PNP 的基础盐培养基(PMM): 在灭菌后的 MM 中加入 200mg/L (终浓度, 下同) 经过滤除菌的 PNP; 含对苯二酚的基础盐培养基(HMM): 在灭菌后的 MM 中加入 100mg/L 经过滤除菌的对苯二酚; LB 培养基: 蛋白胨 10g, 酵母膏 5g, 氯化钠 10g, 去离子水定容至 1,000 mL; 配制固体培养基时在上述配方中加入 15g/L 的琼脂。

LA-Taq 酶购于大连宝生物公司, 其余各化学试剂均为分析纯。抗生素用量 (mg/L): 氨苄青霉素 (Ap) 100, 卡那霉素 (Km) 50。

### 1.3 转座子诱变

将 DLL-E4 和 *E. coli* (pSC123) 分别在 LB 培养基中培养至对数生长期, 各取 1 mL 菌液离心收集菌体, 用无菌生理盐水洗涤数次后重悬, 再将两种菌液混合后用细菌滤器过滤, 使菌体集中于滤膜上。将滤膜有菌体的一面朝上置于 LB 平板上 30℃ 培养过夜后, 用无菌生理盐水将菌体洗下, 稀释一定倍数后吸取 0.1 mL 菌液涂布于加 Ap 和 Km 的 LB 的平板上, 30℃ 培养, 能够生长的菌株即为发生转座突变的菌株。

### 1.4 温度敏感型突变株的分离

用无菌牙签挑取转化平板上单个菌落置于装有 3mL PMM 液体培养基的试管中, 37℃ 过夜培养, 从中筛选出 PNP 降解能力显著下降的突变株 (表现为

培养液中 PNP 的黄色不消失)。37℃ 培养完毕后将试管转移至 30℃ 继续培养 12h, 30℃ 条件下黄色消失的菌落再次接种于 PMM 液体培养基中, 分别置于以上两种温度条件下 180r/min 旋转摇床振荡培养 12h, 检测 PNP 是否降解。选出在 30℃ 能够降解 PNP, 37℃ 不能降解 PNP 的菌株保存。

### 1.5 格里斯试剂法检测亚硝酸根

氯化铵缓冲液: 500mL 容量瓶中加入 250mL 水, 准确加入 10.0mL 盐酸, 振荡混匀, 准确加入 25mL 氨水, 用水稀释至刻度。必要时用稀盐酸和稀氢氧化铵调至 pH9.6 ~ 9.7。

对氨基苯磺酸溶液: 称取 4.00g 对氨基苯磺酸溶于 700mL 水和 300mL 冰乙酸中, 置棕色瓶中混匀, 室温保存。

N-1-萘基乙二胺溶液 (2g/L): 称取 0.2g N-1-萘基乙二胺, 加入 100mL 60% 乙酸溶解混匀后, 置棕色瓶中, 在冰箱中保存, 一周内稳定。

取待测溶液 1mL 稀释至 3.5mL, 加入 0.9mL NH<sub>4</sub>Cl 缓冲液及 0.5mL 的 60% 乙酸后立即加入 0.4 mL 对氨基苯磺酸溶液, 混匀后静置 3 ~ 5min, 再加入 0.2mL N-1-萘基乙二胺溶液, 混匀, 在暗处静置 15min, 观察待测液能否变红以检测是否含有亚硝酸根 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)。

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 浓度的测定方法: 采用分光光度法,  $\lambda = 550\text{nm}$ <sup>[15]</sup>。

### 1.6 PNP 和对苯二酚的降解实验

将温敏型与野生型菌株分别接种至 3mL LB 液体培养基中于 30℃ 培养过夜, 离心收集菌体后用无菌生理盐水洗涤数次并重悬, 10% 接种量分别接种至 PMM 和 HMM 液体培养基中, 分别置 30℃ 和 37℃, 180r/min 旋转摇床振荡培养 12h。样品提取: 12,000 × g, 1min 离心样品, 取上清检测。

PNP 浓度的测定参见文献 [16]。

对苯二酚浓度的测定: 将提取液稀释至 4 ~ 10mg/L 的浓度范围内, 根据对苯二酚在 288nm 处的特征吸收峰的峰值来计算溶液中对苯二酚的含量。

### 1.7 Tn5 插入突变的 PCR 验证

质粒 pSC123 中含有一个序列已知的 Tn5 转座子, 根据该转座子左右两翼序列设计一对引物:

pL: 5' -TCTCAGTCGGTTACATCCCT (175 -

194位);

pR: 5' -GATAAGTCCCCGGTCTAACA (3533~3552位)。

分别以突变株 MT54 基因组 DNA 和质粒 pSC123 DNA 作为模板, 用 LA-Taq 酶进行 PCR 扩增, PCR 反应条件: 94℃ 预变性 4min, 进入热循环: 94℃ 变性 30 s, 54℃ 退火 30 s, 再 72℃ 延伸 3 min, 共 30 个循环。取 PCR 产物进行 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳。

### 1.8 温敏突变株遗传稳定性检测

LB 固体平板上连续传代温敏突变株 10 次, 分别测定其在 30℃ 和 37℃ 在 PMM 培养基上的生长情况及其对 PNP 和对苯二酚的降解情况。

## 2 结果

### 2.1 温敏突变株的筛选及初步鉴定

利用 DLL-E4 降解 PNP 脱硝基生成  $\text{NO}_2^-$  的特性, 使用格里斯试剂, 根据培养液是否会产生红色及红色的深浅来初步判断 PNP 的降解情况, 而对 PNP 降解能力显著下降的突变子进行初筛。从大约 8,000 株突变株中得到 200 余株在 37℃ PNP 降解能力显著下降的突变株, 其中有 1 株在 30℃ 时仍能很好的降解 PNP, 该突变株命名为 MT54。MT54 在 30℃ 条件下能够使 PNP 黄色退去并且产生 53.98 mg/L 的  $\text{NO}_2^-$ , 但在 37℃ 条件下不能够使 PNP 退色并且只能产生 0.58 mg/L 的  $\text{NO}_2^-$ ; 野生型菌株 DLL-E4 在两种温度条件下均能使 PNP 退色, 产生约 53mg/L 的  $\text{NO}_2^-$ 。由此可以初步判断 MT54 是一株 PNP 降解的温度敏感型突变株。

### 2.2 温度对 DLL-E4 和 MT54 降解 PNP 的影响

在 30℃ 和 37℃ 条件下, 野生型菌株 DLL-E4 和温敏突变株 MT54 对 PNP 的降解能力分析结果见表 1。由表可见, 在 30℃ 培养条件下, DLL-E4 和 MT54 降解 PNP 的能力相当, 12h 降解率达 82%; 在 37℃ 培养条件下, 野生型菌株降解 PNP 的能力较 30℃ 略有下降, 但仍能很好地降解 PNP, 说明在这两个培养条件下温度对野生型菌株 DLL-E4 降解 PNP 的能力影响不大。温敏突变株 MT54 在 30℃ 培养条件下降解 PNP 的能力与野生型菌株相当, 但在 37℃ 时几乎不能够降解 PNP。在补充少量其它碳源 (如葡萄糖) 的 PMM 培养基中,

MT54 在 37℃ 能够利用其它碳源生长, 但仍然不能降解 PNP, 而在同等条件下野生型菌株 DLL-E4 能够很好地降解 PNP。

表 1 不同温度条件下 DLL-E4 和 MT54 对 PNP 的降解

	DLL-E4		MT54	
	30℃	37℃	30℃	37℃
对照终浓度 (mg/L)	196.77	197.16	196.77	197.16
PNP 残留量 (mg/L)	35.64	41.87	36.29	195.43
$\text{NO}_2^-$ 生成量 (mg/L)	54.19	52.13	53.98	0.58
降解率 (%)	81.89	78.76	81.56	0.87

### 2.3 温度对 DLL-E4 和 MT54 降解对苯二酚的影响

细胞在代谢过程中普遍存在反馈抑制现象。DLL-E4 降解 PNP 生成对苯二酚, 对苯二酚的积累对 PNP 的降解起反馈抑制作用<sup>[2]</sup>, 并且对细胞有毒害作用。为了进一步确认转座子插入的位置, 检测了 DLL-E4 和 MT54 在两种温度条件下对对苯二酚的降解作用。由表 2 可以看出, 温敏型和野生型菌株在 30℃ 和 37℃ 两种温度培养条件下对对苯二酚的利用能力相当, 12h 降解率都在 80% 左右, 也即温度对 MT54 降解对苯二酚没有显著影响。由此可以推断转座子 Tn5 插入了 PNP 脱硝基相关基因中。

表 2 不同温度条件下 DLL-E4 和 MT54 对对苯二酚的降解

	DLL-E4		MT54	
	30℃	37℃	30℃	37℃
对照终浓度 (mg/L)	83.74	90.17	83.74	90.17
残留量 (mg/L)	14.37	21.51	18.25	24.72
降解率 (%)	82.84	76.15	78.21	72.56

### 2.4 突变子的质粒图谱及插入片段的验证

DLL-E4 和 MT54 均有一个大小相同且大于 23kb 的质粒 (图 1), 说明 DLL-E4 和 MT54 来源于同一个菌株。根据转座子 Tn5 中的已知序列设计引物, 以突变子的基因组 DNA 和 pSC123 质粒 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 都扩增出了大小相同的片段 (图 2), 并且和理论大小 3, 377bp 相符合。这就表明在 MT54 的基因组中确实存在该转座子序列, 证实了 MT54 在 37℃ 失去降解 PNP 的能力是由于转座子插入导致的。

### 2.5 MT54 遗传稳定性

传代 10 次后分在 30℃ 和 37℃ 测定 MT54 对 PNP 和对苯二酚的降解特性, 得到的结果跟亲本

菌株的降解特性一致,说明 MT54 的温敏特性相当稳定(图3、图4)。

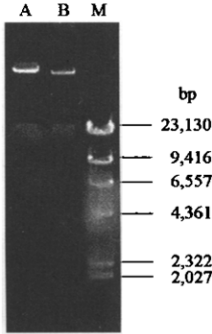


图1 DLL-E4 和 MT54 质粒电泳图谱

M  $\lambda$ DNA/*Hind* III marker, A DLL-E4, B MT54

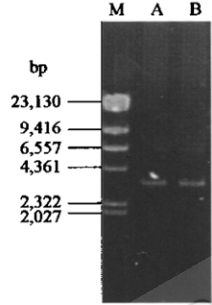


图2 PCR 扩增产物电泳图谱

M  $\lambda$ DNA/*Hind* III marker, A pSC123, B MT54

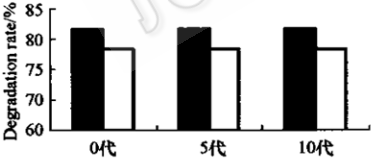


图3 MT54 传代 5 次和 10 次后在 30°C 对 PNP 和对苯二酚的降解率

■ PNP, □ 对苯二酚

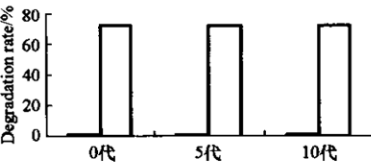


图4 MT54 传代 5 次和 10 次后在 37°C 对 PNP 和对苯二酚的降解率

■ PNP, □ 对苯二酚

### 3 讨论

本实验采用转座子诱变获得了一株 PNP 降解相关基因的温度敏感型突变株 MT54。MT54 在 30°C 条件下能够很好地降解 PNP 和对苯二酚;在 37°C 时几乎不能够降解 PNP 但仍然保留了降解对苯二酚的能力。转座子可能插入了 PNP 降解基因或其调控基因中,由于转座子中含有终止密码子,因此该基因不能完全转录,最终得到不完整的蛋白质,导致该酶在某一特定温度下的稳定性受到严重影响,形成温敏突变。

本实验所用菌株 DLL-E4 控制 PNP 降解的基因则可能位于染色体 DNA 上<sup>[2]</sup>。

### 参考文献

[1] 崔中利, 张瑞福, 何健, 等. 微生物学报, 2002, 42 (1): 19~26.

[2] 刘智, 洪青, 张晓舟, 等. 中国环境科学, 2003, 23 (4): 435~439.

[3] 王竞, 周集伟, 张劲松, 等. 中国环境科学, 2001, 21 (2): 144~147.

[4] Chauhan A, Chakraborti A K, Jain R K. Biochemical and Biophysical Communications, 2000, 270 (3): 733~740.

[5] Shimazu M, Mulchandani A, Chen W. Biotechnology and Bioengineering, 2001, 76 (4): 318~324.

[6] Alber T, Cassidy M B, Zablutowicz R M, et al. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2000, 25 (2): 93~99.

[7] Kitagawa W, Kimura N, Kamagata Y. Journal of Bacteriology, 2004, 186 (15): 4894~490.

[8] 徐剑宏, 洪青, 汪婷, 等. 微生物学通报, 2005, 32 (2): 34~38.

[9] 阮红, Eikmanns B. 微生物学报, 2002, 42 (3): 327~330.

[10] 陈永辉, 史贤明. 微生物学报, 2005, 45 (6): 952~954.

[11] 高新起. 微生物学通报, 2000, 35 (9): 31~32.

[12] 王洪凯, 林福呈, 李德葆. 微生物学报, 2002, 42 (5): 634~639.

[13] 刘智, 孙建春, 李顺鹏. 应用于环境生物学报, 1999, 5 (10): 147~150.

[14] 刘智, 李顺鹏. 土壤学报, 2003, 40 (2): 293~297.

[15] 耿丽娜. 数理医药学杂志, 2001, 14 (1): 65.

[16] 郭坤梅, 邓友军. 环境污染与防治, 1998, 20 (1): 47~49.