

利用转座质粒 *plasposon* 构建荧光标记的脱色希瓦氏菌 S12^{*}

李光飞^{1,1} 邓代永¹ 许枚英¹ 岑英华¹ 孙国萍^{1**}

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

(广东省微生物研究所菌种保藏与应用重点实验室 广州 510071)

摘要: 采用分子生物学手段将具有转座功能的自杀性质粒 pTnMod-okm 与荧光蛋白基因 *eyfp* 构建重组质粒 pTE-okm。pTE-okm 通过结合转移进入脱色希瓦氏菌 S12 中,质粒上的转座子元件转座到 S12 的染色体上,而质粒本身的窄宿主复制位点使其在 S12 中不能得到有效的复制而“自杀”。荧光显微镜下筛选表达荧光蛋白的脱色希瓦氏菌克隆,通过对其提取质粒确定 pTE-okm 已经在脱色希瓦氏菌中自杀。筛选得到生长速度未发生延迟、脱色能力不受影响的荧光标记菌株 S12-40。标记的脱色希瓦氏菌在无抗生素压力的情况下培养,传代 20 次(8h/次)后在荧光显微镜下依然查看到荧光蛋白的表达。该菌株的构建为研究其生态学行为奠定了基础。

关键词: 荧光蛋白,脱色希瓦氏菌 S12, Plasposon

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)06-1174-05

Construction of Fluorescent Labeled *Shewanella decolorationis* S12 Using Plasposon^{*}

LI Guang-Fei^{1,1} DENG Dai-Yong¹ XU Mei-Ying¹ CEN Ying-Hua¹ SUN Guo-Ping^{1**}

(Wuhan Institute of Virology, CAS, Wuhan 430071) (Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070)

Abstract: The plasmid pTE-okm, which was obtained by inserting the fluorescence gene *eyfp* into the plasposon pTnMod-okm, transferred from *E. coli* S17-1 into *Shewanella decolorationis* S12 by conjugation. pTE-okm could not replicate in *Shewanella decolorationis* S12 because of its narrow-host-range replication origin, but the mimitransposon within pTE-okm could transpose to the chromosome of *Shewanella decolorationis* S12 and made it survive the LB medium with kanamycin and rifampicin. The clones which expressed fluorescence gene *eyfp* were screened from all the clones on the selected plates under fluorescent microscope and it was make sure that pTE-okm didn't exist in these clones. S12-40, which had the the same growth rate and decoloration ability with the original strain S12-1, was picked out within these clones. S12-40 expressed EYFP stably even after successive re-culturing for 20 times (8h/time). The construction of S12-40 laid a foundation for the study on the ecological performance of *Shewanella decolorationis* S12.

Key words: Fluorescent protein, *Shewanella decolorationis* S12, Plasposon

希瓦氏菌具有相对复杂多样的代谢途径,可以还原众多的有机物、金属离子甚至放射性元素。希瓦氏菌在修复被难降解的有机物、重金属所污染的环境和利用多样的呼吸方式进行生物燃料电池开发上具有独特的潜力。希瓦氏菌被研究人员广泛的关注,脱色希瓦氏菌 S12(*Shewanella decolorationis*)是我们从处理印染废水的反应器中分离得到的一株具有广谱脱色能力的希瓦氏菌新种^[1]。该脱色希瓦氏菌具有可以利用多种物质作为电子受体的呼吸方

式,如偶氮类染料、腐殖质、Fe(III)^[2,3]。理论上可作为微生物呼吸和生物膜发育形成的模式菌种,是一株理想的环境修复功能微生物^[4]。脱色希瓦氏菌的较强还原能力可以在生物燃料电池的开发上^[4],尤其在利用工业废水发电中有很广阔的应用前景。生物标记技术的应用可以方便的了解投放到环境中的微生物的生态学行为。赋予被标记生物光学特性的荧光标记技术在各种生物标记手段中具有不可比拟的感官优势。常用的荧光标记手段有荧光酶标记和

* 国家自然科学基金(No. 30670020) 国家高技术研究发展计划(863)项目(No. 2006AA06Z322) 广东省科技攻关项目(No. 2004A30404002)

** 通讯作者 Tel/Fax 020-87684471, E-mail: gpsun@gis.sti.gd.cn

收稿日期:2007-01-12, 修回日期:2007-05-08

荧光蛋白标记^[5,6],其中荧光蛋白标记具有不依赖底物,发光稳定,可进行活细胞实时原位观察等优点而被广泛运用。

对细菌进行荧光标记可通过将携带荧光蛋白基因的质粒转化目的菌株或者将荧光蛋白基因整合到目的细菌的染色体上而达到。由于质粒在细菌体内存在丢失和转移到其它微生物的可能性,由此带来荧光标记的不稳定性和可能的生态风险。将外源荧光蛋白基因整合到目标生物主要染色体上的方法可以有效的保证荧光标记的稳定^[7]。

本文中我们采用 *plasposon* 系统来将荧光蛋白

基因 *eyfp* 同卡那霉素抗性基因插入到脱色希瓦氏菌 *S12* 的染色体中^[8],通过筛选得到一株表达荧光而原有的生理功能未受影响的重组子。并通过设计位于转座元件内的测序引物获知 *Kanr:eyfp* 整合到 *S12* 染色体上的位置。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 本实验中使用到的菌株和质粒见表 1。

表 1 本实验中用到的菌株和质粒

Strains or plasmids	Characteristics	Reference or source
Strains :		
<i>Shewanella decolorationis</i> S12		Reference ^[1]
<i>Shewanella decolorationis</i> S12-1	Rifr selected form the <i>Shewanella decolorationis</i> S12	This work
<i>Shewanella decolorationis</i> S12-40	Rifr Kanr : <i>eyfp</i> derived from <i>Shewanella decolorationis</i> S12-1	This work
<i>E. coli</i> S17-1	Tpr Smr recA , thi , pro , hsdR-M + RP4 2-Tc :Mu : Km Tn7 λpir	Reference ^[8]
<i>E. coli</i> DH5α	supE44ΔlacU169 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	This laboratory
Plasmids :		
pTnMod-okm	Kan ^r ,RP4 oriT pMB1oriR Mob ⁺ Trans ⁺	Reference ^[8]
pEYFP	Ampr ,Plac pUC19 vector with <i>eyfp</i> gene	This laboratory
pTE-okm	Kan ^r : <i>eyfp</i> pTnMod-okm vector with <i>eyfp</i> gene	This work

1.1.2 培养基和试剂: M9 培养基^[9]; LB 培养基^[9], 培养基中如果需要加入抗生素,则按下面的浓度加入: 氨卞青霉素 100μg/mL、卡那霉素 50μg/mL、利富平 50μg/mL。

限制性内切酶 *Eco*RI、*Hind* III、*Spe* I、*Xba* I 以及 T4 DNA 连接酶购自华美生物工程公司; Taq DNA 聚合酶, dNTPs 购自申能博彩公司; 蛋白酶 K, RNaseA 购自 Sigma; DNA 分子量标准 DL3000 与 λ-*Eco*RT digest 购于 TaKaRa 公司; 电泳级琼脂糖由 Sigma 生产广州赛百盛分装; 凝胶回收试剂盒由天为时代生物技术公司生产。

2 方法

2.1 质粒构建与转化

pTnMod-okm 是由 Tn5 转座子元件、来自 RP4 的结合转移诱动基因序列、窄宿主复制位点 pMB1 以及卡那霉素抗性基因组成的质粒,它只能在 *E. coli*

S17--1 中复制而不能在其他革兰氏阴性菌株中复制,由此被称为自杀质粒,并可以通过结合转移至多数革兰氏阴性菌^[7]。质粒 pEYFP 是在 pUC19 质粒的多克隆位点插入 EYFP 基因构建而成。EYFP 蛋白是 GFP 蛋白的衍生型,其中有六处氨基酸发生了改变,使其折叠效率和荧光强度都获得了提高。它在 513nm 波长处有最大吸收峰,激发峰波长为 527nm。重组质粒构建过程见图 1, DNA 分子操作的程序参见文献 [9]。

重组质粒转化感受态 *E. coli* S17--1 细胞。挑取 Kanr 表型菌株,通过酶切和 PCR 鉴定。PCR 鉴定使用 *eyfp* 特异性引物,引物序列为: Pe1 :5' ACT AGA GGA TCC CGG GTA 3' Pe2 :5' AAG CGG CCG CGA CTC TAG TGC 3' 得到的质粒命名为 pTE-okm。菌种命名为 *E. coli* S17--1/pTE-okm。

2.2 结合转移与重组子的筛选

脱色希瓦氏菌(*Shewanella decolorationis*)的利福

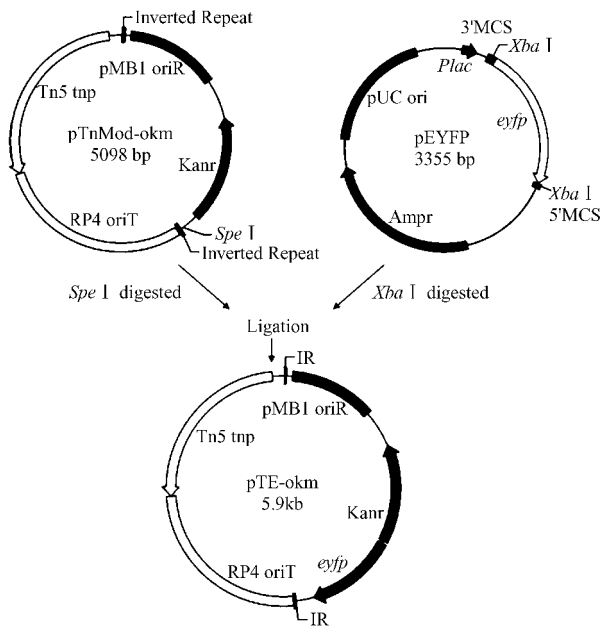


图1 重组质粒 pTE-okm 构建示意图

平抗性菌株在具有利福平浓度梯度(0~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每梯度升高10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的LB培养基中进行筛选而得到。在含50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 利福平的LB琼脂平板上分离纯化到利福平抗性菌株S12-1。携带pTE-okm的*E. coli* S17-1作为供体菌,S12-1作为受体菌,分别培养过夜达到对数生长期后3500r/min离心收集菌泥以去除原培养基中的抗生素残留,将供体菌和受体菌的菌泥分别重悬于50 μL LB培养基中,混合后涂布在无抗性的LB琼脂平板上30 $^{\circ}\text{C}$ 共同培养18h使pTE-okm通过接合转移进入S12-1中且有充足时间使质粒上携带有荧光蛋白基因的转座子转移到S12-1的染色体上。然后将混合培养长成的菌苔使用LB培养基从平板上吹打下来,将混合菌体悬液在含卡那霉素与利福平的LB琼脂平板上均匀涂布。由于pTE-okm在S12-1中无法复制,只有pTE-okm上带有卡那霉素抗性的转座子元件发生转座并插入S12-1染色体的重组菌才能够生长^[8]。在卡那霉素与利福平的LB琼脂平板上30 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜后挑取长势良好的单菌落,逐个涂片在荧光显微镜下观察。从中筛出荧光强度较高的重组子,设计针对pTE-okm上转座子元件以外序列的引物(UP:5'GCAGGGCTTCCCAACCTTCCCAGAG 3' DN:5'GAGGCCACCACATTCCGCCACCGTAG 3'),使用该引物以重组子全基因组DNA做为检测模板;分别以S12-1基因组和pTE-okm质粒DNA作为阴性和阳性

对照模板进行PCR扩增以检测pTE-okm质粒是否“自杀”。重组子接种于含1mmol的苋菜红偶氮染料的LB培养基中检测脱色能力^[10];在LB培养基中接种相同的菌体在34 $^{\circ}\text{C}$ 下震荡培养,每30min取样在 OD_{600} 处测定光密度,比较各菌体的生长速度。选择生长速度、脱色速度与野生型菌株接近的重组荧光标记菌株作连续传代培养^[5],在荧光显微镜下观察荧光表达稳定性。

2.3 S12-1中荧光蛋白表达

经过连续传代培养后筛选得到可以稳定表达荧光蛋白的S12-40菌株与S12-1、*E. coli* S17-1及1mmol IPTG诱导的*E. coli* S17-1;pEYFP在30 $^{\circ}\text{C}$ 培养16h后各取1mL,离心收集菌体使用0.5mL PBS缓冲液重悬菌体。放于超声波破碎仪上间隔10s破碎10s,总破碎时间为10min。细胞裂解液12000r/min离心10min,取适量上清与PAGE电泳上样缓冲液混合后在4 $^{\circ}\text{C}$ 进行非变性电泳。电泳后将凝胶先后在长波紫外线照射下和使用普通考马斯亮蓝染色对比观察电泳条带^[9]。

2.4 S12-1中eyfp基因定位

参考文献11采用CTAB法提取S12-40的基因组总DNA,用1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的Rnase 37 $^{\circ}\text{C}$ 处理30min后上样于0.7%琼脂糖凝胶电泳检测,查看总DNA提取效果。设计转座子元件右端延伸方向为转座子外侧的测序引物,引物序列:5'CTG CTG GAG TTC GTG AC 3'。以S12-40基因组为模板送至英俊生物技术公司进行测序。测序结果在NCBI数据库中与希瓦氏菌MR-1基因组序列比对,分析转座元件插入的位置。

3 结果

3.1 重组质粒的构建

使用内切酶Xba I消化pEYFP质粒,凝胶电泳后回收得到大小为772bp的荧光蛋白基因片段。将该片段与被限制性内切酶Spe I消化的质粒pTnMod-okm使用T4 DNA连接酶连接并转化S17-1。提取转化子质粒分别使用Hind III和Eco R I酶切分析,设计荧光蛋白基因特异性引物以重组质粒为模板进行PCR扩增。酶切和PCR产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果见图2。可以从重组质粒pTE-okm中扩增出和EYFP基因相同大小的DNA片段;并且

pTE-okm 的单酶切产物比载体 pTnMod-okm 要大,凝胶成相系统软件分析的结果显示 pTE-okm 比 pTnMod-okm 大约 720bp。可以证实重组质粒构建成功。

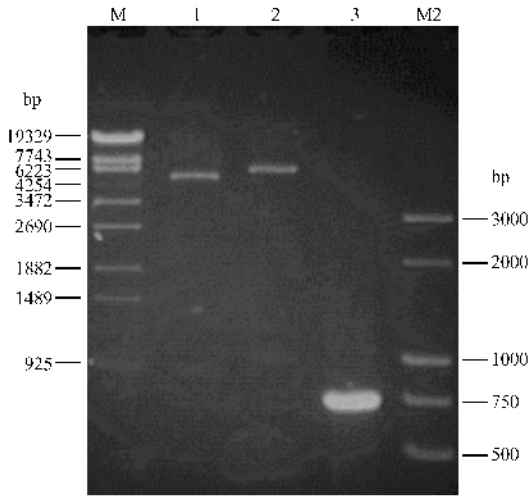


图2 重组质粒的酶切和 PCR 分析

M1 λ DNA-Eco14T digest ;M2 DNA 分子量标准 DL3000 ;1 pTnMod-okm EcoR I digest ;2 pTE-okm EcoR I digest ;3 PCR product of *eyfp* , pTE-okm as template

3.2 重组菌株的筛选

以携带 pTE-okm 的大肠杆菌 S17-1 作为供体菌,脱色希瓦氏菌 S12-1 为受体菌在无抗生素平板上完成结合转移,重新悬浮后涂布在卡那霉素和利福平的平板上进行筛选,得到系列双抗性重组子。综合考虑各重组子对偶氮染料的脱色速率和自身菌体的生长速度(图3),选取其中荧光激发较强的 S12-40 做进一步的分析。CTAB 法提取 S12-40 的总 DNA,碱裂解法提取其质粒,电泳显示观察不到质粒分子的存在,针对质粒上序列的 PCR 结果为阴性。表明 S12-40 菌株荧光蛋白的表达和卡那霉素抗性

的获得是由转座到染色体上的外源 DNA 提供的。将 S12-40 在无抗生素的情况下,在 LB 培养基中连续传代培养 20 次(8h/次),然后使用荧光显微镜观察菌体(图4)。

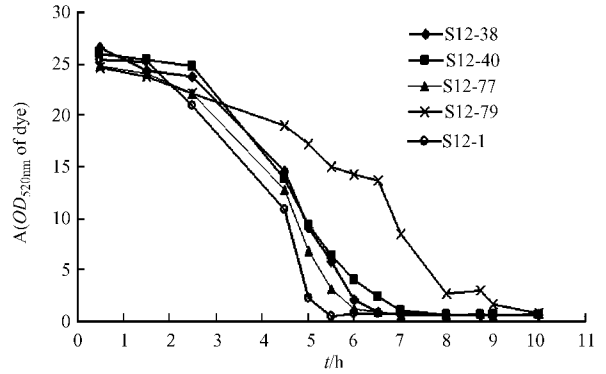


图3 重组子对偶氮染料的脱色速率

3.3 荧光蛋白非变性凝胶电泳

在紫外光的照射下荧光蛋白可以不依赖底物而受激发射荧光。菌体细胞裂解液中的荧光蛋白在经过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳而与其它菌体蛋白分离后,在长波紫外灯的照射下可以看到规则的带状激发荧光,然而经过 G-250 染色后的同一块蛋白胶不再能有带状荧光出现,可以确定荧光是由活性蛋白质发出的。图5中分别以 S12-1 和 *E. coli* S17-1/pEYFP 的细胞裂解蛋白为阴性和阳性对照。上样有 S12-1 全细胞蛋白的泳道3中没有荧光激发出来,而在上样有标记了荧光蛋白基因的重组子 S12-40 全细胞蛋白的泳道2中可以看到与阳性对照中 *E. coli* S17-1/pEYFP 位置相对的荧光激发条带。在右侧的 G-250 染色的电泳图片 M 泳道中的 A 和 B 为分子量标准,分子量分别为 57kD 和 28.4kD,C 标示的地方

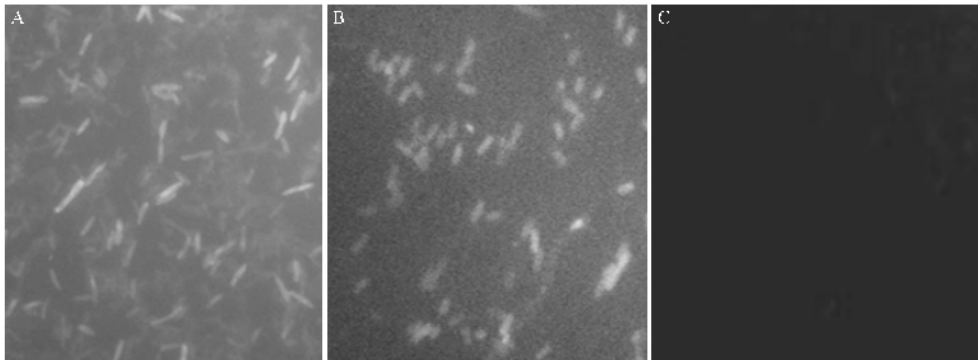


图4 S12-40 菌体的荧光显微镜照片(1000×)

A *E. coli* S17-1/pEYFP ;B *Shewanella decolorationis* S12-40 ;C *Shewanella decolorationis* S12-1

为荧光蛋白的位置,荧光蛋白分子量大小估计为27kD左右,与文献报道相符。因为阳性对照 *E. coli* S17-1/pEYFP 的菌体在 IPTG 诱导下有大量 GFP 蛋白表达出来,故条带亮度远比 S12-40 的要亮的多;在 S12-40 中 GFP 表达的量比较少,以至于在 G250 染色下条带几乎不可见。可见这种在紫外线照射下检测 SDS-PAGE 中 GFP 蛋白条带的方法更加灵敏。以上现象可以表明在 S12-40 细胞中的确有荧光蛋白的表达。

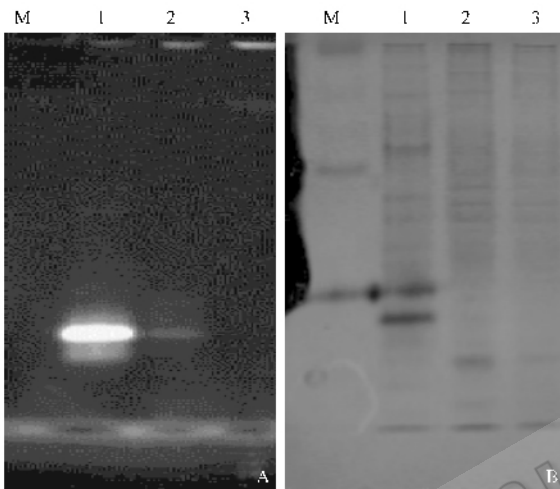


图5 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 S12-40 中荧光蛋白的表达

A 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后在紫外线下照片;B 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后用 G250 染色后照片。M 分子量标准由上至下 57kD,28.4 kD 1: *E. coli* S17-1/pEYFP 全细胞蛋白,2 S12-40 全细胞蛋白,3 S12-1 全细胞蛋白

3.4 PCR 产物测序结果与 *eyfp* 基因定位

使用扩增 *eyfp* 基因的特异性上游引物,以质粒 pTE-okm 为模板的测序结果与 *eyfp* 基因的 DNA 序列比对结果显示质粒 pTE-okm 中的确存在 *eyfp* 基因。位于转座子元件内,DNA 延伸端指向转座子元件外侧的 5'CTG CTG GAG TTC GTG AC 3'序列为引物测得的 690bp 序列和 *Shewanella decolorationis* MR-1 基因组序列比对结果显示该段序列与 MR-1 中的 SO2027 基因序列一致性高达 98.67%。希瓦氏菌 S12 与 MR-1 在基因序列上并不是完全的一致,我们对 S12 中几个基因的克隆测序中都显示了很高的序列一致性(EF198254、EF104520、AJ609571),由此推断在 S12-40 中转座子元件位于与 SO2027 基因同

源的 ORF 序列之后。

4 讨论

利用转座子元件可以方便的将标记基因转入到目的菌株中,不需要对目的菌的遗传背景了解得十分详细,只需要在转座完成后经过有效率的筛选策略就可以得到满意的重组子。标记基因插入到细菌的染色体上的方式比标记基因位于质粒上所构建的重组子遗传稳定性要好。但是这种插入染色体上的标记基因往往以单拷贝的方式存在,表达标记基因的程度较弱,需要借助荧光显微镜才可以观察到荧光的激发。另外跟随转座子一起进入染色体的卡那霉素抗性基因,由于转座元件具有潜在的解离可能性而带来抗性基因漂移的生态风险。同样的原因也会导致部分标记重组子在实际应用中丢失标记基因摆脱有效跟踪。如果对目的标记菌株的遗传背景有充分的了解以后,利用同源重组的方式在特定的位点插入标记基因的方式可以克服使用重组子标记的不足。在重组子筛选初期,在显微镜下荧光激发的普遍较强,而后经过传代培养以后荧光有逐渐变弱并稳定在一个水平的情况。分析原因是由于自杀质粒的自杀需要一个过程,在自杀质粒未被自身的复制充分稀释之前,质粒上存在的标记基因对荧光蛋白的表达起到了加强作用。

参考文献

- [1] Meiyong XU, Jun Guo, Guoping Sun, et al. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2005 55: 363 ~ 368.
- [2] 许志诚, 洪义国, 孙国萍, 等. 微生物学报 46(4): 591 ~ 597.
- [3] Yiguo Hong, Meiyong Xu, Guoping Sun, et al. Respiration and Growth of *Shewanella decolorationis* S12 with Azo Compound as Sole Electron Acceptor. AEM.(2006), Nov doi: 10.1128/AEM.01415 ~ 06.
- [4] Justin C. Biffinger, Jeremy Pietron, Bradley R. Ringeisen, et al. Biosensors and Bioelectronics. 2007 22(8): 1672 ~ 1679.
- [5] 徐剑洪, 武俊, 洪青, 等. 微生物学报 46(4): 613 ~ 617.
- [6] Omm M, Cubitt A B, Remington S J, et al. Science, 1996, 273: 1392 ~ 1395.
- [7] M Pistorio, L J. Balague, A Lagares. FEMS Microbiology letters, 2002 214: 165 ~ 170.
- [8] Jonathan J Dennis, Gerben J Zylstra. AEM, July 1998, 64: pp. 2710 ~ 2715.
- [9] J. 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. (第三版) 北京: 科学出版社, 2002. pp. 1595 ~ 1605
- [10] 许玫英, 钟小燕, 孙国萍, 等. 微生物学通报. 2005 32(1): 5 ~ 9.
- [11] 陈桐生, 李建军, 岑英华, 等. 应用与环境生物学报, 2006, 12(1): 113 ~ 117.