

脱卤脱亚硫酸菌脱氯呼吸链的遗传分析*

宋冬林

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

摘要 以携有结合转座子 Tn916 的 *Enterococcus faecalis* JH2-2 为供体, 脱卤脱亚硫酸菌 HSS1 (*Desulfitobacterium dehalogenans*, Sm 抗性突变株) 为受体, 在厌氧条件下, 通过滤膜杂交、结合转移, 将 Tn 916 转移并插入到受体菌的染色体上, 其转移频率为: $1.1 \times 10^{-7} \sim 3 \times 10^{-8}$ 。在内酮酸/乳酸-3-氯-4-羟基苯氧乙酸、Tc、Sm 培养基上, 筛选脱氯呼吸的缺陷型突变株, 并用反向 PCR (Inverse-PCR) 技术, 获得插入相应位点的染色体 DNA 片段, 进一步分析脱氯呼吸链的遗传背景。

关键词 还原脱氯, Tn916 转座子, 结合转移

分类号 Q933 **文献识别码** A **文章编号** 0253-2654(1999)-02-0085-87

GENETIC ANALYSIS OF *DESULFITOBACTERIUM DEHALOGENANS* DECHLORORESPIRATION CHAIN

Song Donglin

(Wuhan Institute of Virology, The Chinese Academy of Science, Wuhan 430071)

Abstract *Enterococcus faecalis* JH2-2, carrying Tn916, was taken as donor, *Desulfitobacterium dehalogenans* as recipient. Under anaerobic condition, transfer Tn916 into the recipient by filter mating and conjugation transferring. The frequency was: $1.1 \times 10^{-7} \sim 3 \times 10^{-8}$ per recipient. On the medium, containing Pyruvate / Lactate-CIOHPA, Tet, Sm, Screen mutants deficiency in dechlororespiration. Obtain chromosome DNA fragment flanking Tn916, by Inverse PCR techniques, then, investigate its genetic fundament involved dechlororespiration.

Key words Reductive dechlorination, Transposon 916, Conjugative transfer

细菌的脱氯呼吸 (dechlororespiration) 是指厌氧细菌中存在的以有机氯化物为电子受体, 通过电子传递链, 获得能量的呼吸代谢方式。研究表明, 这种呼吸代谢方式在消除环境中

机氯污染物的脱氯降解过程中, 起着重要作用。

* 本工作得到“王宽诚留学基金”的资助。

Wang Kuang Chen Education sponsor of this works

1998-02-15 收稿, 1998-05-10 修回

但目前人们对其生化机制及其遗传基础一无所知^[1],其中 *D. dehalogenans* 具有广泛的底物代谢范围和较快的生长速率^[2],因而拟将其作为模式材料,研究细菌脱氯呼吸遗传基础。由于细菌结合转座子(Transposon 916)Tn916 具有广泛的宿主范围^[3],被广泛用于细菌的遗传学研究。

我们在此项研究中,首次成功在厌氧条件下,进行 Tn916 的结合转移,建立了结合转移的方法,获得多种类型结合子,使我们能进一步研究各种突变型与细菌脱氯呼吸的关系。

1 材料与方法

1.1 菌种、材料

D. dehalogenans HSS1: 由 Utikin 提供的野生菌育种得到的 Sm 抗性突变株。

pGEM[®]-T 为 Promega 提供的用于克隆 PCR 产物的多功能载体,由于其两端被修饰,对被克隆的 PCR 产物末端无特殊要求。

pCII82 为含有 Tn916 中 TetM 基因的质粒。

1.2 试剂、培养基

THMS: 30m mol / L Tris-HCl, 3m mol / L MgCl₂, pH8.0 于 25% 蔗糖中; TES: 50m mol / L Tris-HCl, 5m mol / L EDTA, 50m mol / L NaCl, pH8.0; MM: 厌氧无机盐培养基(按参考文献[2]) MMP: MM + 丙酮酸; MML: MM + 乳酸-3-氯-4-羟基苯氧乙酸; GM17: M17[Merck, M17] + 5% 葡萄糖; Sm: 链霉素(2000μg / mL), TC: 四环素(10μg / mL)不同使用浓度另注。

1.3 质粒、染色体 DNA 分离

质粒分离按 Sambrook^[4]碱裂解法进行;染色体 DNA 分离在 Leenhouts^[5]基础上修改,由于菌体量少,需 10~15mL 的培养物,菌体悬浮于 1mL THMS 中,用酚 / 氯仿抽提两次。

1.4 转座子 Tn916 的结合转移

将供体菌接种于 GM17(Tc)中,30℃ 过夜培养,结合杂交前,按 5% 量接种至厌氧处理的 GM17(Tc, 2μg/mL)中,37℃ 培养 2~3h (OD₆₀₀ = 0.2~0.4),将受体菌于 MM 培养基 (20mL,

含 Sm) 中培养 16~24h,在厌氧室内采用过滤法收集并洗涤菌体;同时收集 JH2-2 培养物,离心洗涤一次,受体与供体以 5:1 的比例混合,过滤于同一张滤膜上,转移滤膜于 MM 固体培养基上,将培养皿置于厌氧罐内,30℃ / 37℃ 培养 6~16h,取滤膜于试管内振荡洗脱菌体,涂于含有 Tc, Sm 的培养基上,筛选结合子。

1.5 DNA 扩增

利用逆向 PCR 技术扩增含有 Tn916 的结合子的染色体 DNA 片段。参照 Mattsson^[6]的方法制备 PCR 扩增用的模板 DNA,引物为 P₁₅₃₇和 P₁₅₄₆(见文献[7]),扩增反应条件为:94℃,5min 处理;94℃,20S,54℃,30S,68℃,2min 40 循环后,68℃,7min。

1.6 克隆和杂交

将 PCR 片段直接与多功能 pGEM[®]-T 质粒连接,将得到的重组质粒进行 Nick translation 获得 ³²P 标记探针,与 HindIII 消化后的结合子的染色体 DNA 进行杂交,杂交方法参照 Sambrook^[4],洗膜温度为 68℃。

2 结果与讨论

2.1 Tn916 的结合转移

由于 *D. dehalogenans* 是新分离的严格厌氧菌,对其生理代谢特征了解甚少,存活率达 90% 的纯培养技术也是作者经多次反复建立的。通过多次反复使结合转移率进一步提高(详见表 1),结果表明,杂交前供体若经短期厌氧增殖,明显有利于提高转移率,且增殖时四环素浓度不宜过高,因为高浓度四环素会导致受体的抗性突变,同时会降低结合转移率,因

表1 Tn916从*E. faecilis*到*D. dehalogenans*的结合转移率

杂交条件	供体(CFU/ m)	受体(CFU/ m)	结合转移率 (结合子/受体)
30℃, 6h	6×10 ⁸	6.8×10 ⁷	4.0×10 ⁻⁷
30℃, 16h	5.4×10 ⁸	1.2×10 ⁹	6.4×10 ⁻⁷
37℃, 6h	6×10 ⁸	1.02×10 ⁸	1.1×10 ⁻⁷
37℃, 16h	1.8×10 ⁸	3.28×10 ⁸	30×10 ⁻⁷

此我们选择杂交前受体增殖时四环素浓度为 $2\mu\text{g}/\text{mL}$, 而结合子的筛选时的四环素浓度为 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2 细菌脱氯呼吸缺陷型的筛选

D. dehalogenans 能利用丙酮酸以发酵呼吸方式获得能量; 也能以 3-氯-4-羟基苯氧乙酸为电子受体, 以乳酸为电子供体进行呼吸代谢, 但不能单独以乳酸为唯一碳源。利用该菌的这一特征, 将杂交转移获得的结合子, 分别在 MMP / MML 固体培养基上划线培养, 筛选与脱氯呼吸相关的缺陷型, 野生型及一般的结合子都能在 MMP / MML 培养基上生长, 而脱氯呼吸相关的突变型由于其脱氯呼吸链受阻, 仅能利用丙酮酸在 MMP 培养基上生长, 不能在 MML 培养基上生长, 通过这一设想筛选出几十株脱氯呼吸的突变型, 复筛过程中曾发现回复突变较高, 给筛选工作带来一定难度 (结果有待整理)。

2.3 缺陷型结合子 Tn916 插入位点 DNA 扩增

Tn916 分子量大小为 18Kb ^[3], 其左臂 ($3'$ 端) 有一编码四环素抗性的基因 *tetM*, 整个转座子仅在此基因中含有一个 *HindIII* 的酶切位点, 引物即是在此酶切位点的左侧和转座子 $3'$ 末端, 通过反向 PCR 技术获得 Tn916 插入位点左侧结合子的染色体 DNA, 由此获得多个不同缺陷突变株的染色体 DNA, 采用同样方法, 在 *tetM* 中 *HindIII* 酶切位点的右侧和转座子的右侧, 设计一对引物, 获得 Tn916 插入位点右侧的染色体 DNA 由此获得多个不同缺陷突变株的染色体 DNA。

2.4 突变型基因功能的分析

通常将扩增的 DNA 产物直接克隆到 pGEM[®]-T 上, 为了证实所获的 DNA 来自突变

型结合子, 以此 DNA 片段为探针, 与结合子进行杂交分析, 以 $P_{1357/1546}$ 为引物, 通过反向 PCR 获得脱氯呼吸突变株 5B6410 的 DNA 片段为探针, 与不同突变株杂交的结果, 表明不同结合子中转座子的插入位点是不一样的, 并且同一结合子可以插入两个转座子; 将所获的 DNA 片段测序, 每对引物所获结果, 与基因库中已知基因同源性进行比较, 发现其缺陷突变发生在与厌氧脱氯呼吸电子转移相关的酶系中, 一株为 ATP-转移酶缺陷, 另一株为细胞色素 NADH 氧化酶缺陷, 两种酶都位于细胞膜上, 与呼吸链电子转移相关, 此结果有待进一步获得完整结构基因、进行表达产物分析后逐步绘出完整的脱氯呼吸链基因图。

致谢 作者在荷兰 Wageningen 农大留学期间进行的本工作中, 得到 J van der Oost 和 H Smidt 博士的悉心指导和帮助, 在此一并表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Sanford R A, Cole J R, Loffer F E *et al.* Appl Environ Microbiol, 1996, 62(10):3800~3808.
- [2] Utkin I, Woese C, Wiegel J, In J Syst Bacteriol, 1994, 44:612~619.
- [3] Salyers A A, Shoemaker N B, Stevens A M *et al.* Microbiol Rev, 1995, 59:579~590.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring press. Cold Spring Harbor, New York 1989.
- [5] Leenhouts C J, Marugg J D, Gasson M J. Eur Patent Appl, 1992, 10:487.
- [6] Mattsson D M, Rogers P. J Industrial Microbiol, 1994, 13:258~268.
- [7] Stingle F, Neeser J, Mollet B. J Bacteriol, 1996, 176(6):1680~1690

本 刊 声 明

凡本刊刊出的稿件, 除在本刊发表出版使用外, 还将以《光盘版》等形式出版使用, 作者如不同意, 敬请来稿时声明。