

崔长征, 沈萍, 张甲耀, 等. 2011. 利用绿色荧光蛋白标记革兰氏阴性细菌的研究 [J]. 环境科学学报, 31 (2): 276–282
Cui C Z, Shen P, Zhang J Y, *et al*. 2011. Labeling gram-negative bacteria using green fluorescent protein [J]. Acta Scientiae Circumstantiae 31 (2): 276–282

利用绿色荧光蛋白标记革兰氏阴性细菌的研究

崔长征^{1*}, 沈萍², 张甲耀³, 冯耀宇¹, 林匡飞¹

1 华东理工大学资源与环境工程学院 国家环境保护化工过程环境风险评价与控制重点实验室, 上海 200237
2 武汉大学生命科学学院, 武汉 430072
3 武汉大学资源与环境科学学院, 武汉 430072
收稿日期: 2010-05-26 修回日期: 2010-07-05 录用日期: 2010-07-15

摘要: 构建了具有不同抗性且能够组成型表达绿色荧光蛋白的一系列转座子质粒 pTnMod-OCm-G、pTnMod-OTc-G、pTnMod-OKm3-G 和 pTnMod-OGm-G, 并通过三亲本杂交的方法, 成功地将荧光蛋白基因分别插入到多环芳烃降解菌株 *Sphingomonas* sp. 12A 和 *Pseudomonas* sp. 12B 的基因组内, 获得了具有降解多环芳烃特性, 同时在没有抗生素选择压力下连续传代多次仍能够稳定组成型表达荧光的转化子. 结果表明, 该系列转座子不仅适合其它革兰氏阴性菌的遗传标记, 也为进一步研究降解菌在污染环境中的存活能力和生态安全奠定了基础.

关键词: 绿色荧光蛋白; 组成型表达; 转座子; 生物降解

文章编号: 0253-2468 (2011) 02-276-07 中图分类号: X172 文献标识码: A

Labeling gram-negative bacteria using green fluorescent protein

CUI Changzheng^{1*}, SHEN Ping², ZHANG Jiayao³, FENG Yaoyu¹, LIN Kuangfei¹

1 State Environmental Protection Key Laboratory of Environmental Risk Assessment and Control on Chemical Process School of Resources and Environmental Engineering East China University of Science and Technology, Shanghai 200237
2 College of Life Science, Wuhan University Wuhan 430072
3 College of Resource and Environmental Science Wuhan University, Wuhan 430072

Received 26 May 2010 received in revised form 5 July 2010 accepted 15 July 2010

Abstract In this study, four transposable plasmids were constructed: pTnMod-OCm-G, pTnMod-OTc-G, pTnMod-OKm3-G and pTnMod-OGm-G, which can constitutively express green fluorescent protein. Via triparental mating, the GFP gene was inserted into genomes of *Sphingomonas* sp. 12A and *Pseudomonas* sp. 12B, two polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading bacterial strains. The transformants, which can degrade polycyclic aromatic hydrocarbons, can constitutively express GFP without the presence of antibiotics through many generations of propagation. The transposons can be transferred to other gram-negative bacteria and expressed stably. Therefore, they have potential to be used in research on bacterial survival and ecological safety in contaminated environments.

Keywords green fluorescent protein; constitutively express; transposons; biodegradation

1 引言 (Introduction)

实验室条件下, 典型有机污染物的微生物降解能够取得较理想的效果, 然而自然条件下生物修复成功的案例仍较少 (Mohan *et al.*, 2006), 其中一个重要原因是生物强化过程中引入的外源降解微生物在污染环境中受土著微生物、重金属、环境条件变化等因素的影响, 使降解微生物的存活能力和降

解活性降低 (Tang *et al.*, 2005; Heinaru *et al.*, 2005). 同时, 有必要对具有较强存活能力的外源微生物进行生态风险评价, 以防止其对人类健康和生态环境可能带来的不利影响. 因此, 对引入的外源降解菌进行追踪检测就显得十分必要.

绿色荧光蛋白 (Green Fluorescent Protein, GFP) 具有无种属特异性、荧光特性稳定、分子量小、对细胞安全等优点, 因而在微生物定殖、动态检测等研

基金项目: 国家博士后特别资助基金项目 (No. 200902093)
Supported by the National Science Foundation for Post-doctoral Scientists of China (No. 200902093)
作者简介: 崔长征 (1978—), 男, 助理研究员 (博士); * 通讯作者 (责任作者), E-mail: cuihangzheng@ecust.edu.cn
Biography: CUI Changzheng (1978—), male assistant professor (Ph.D.); * Corresponding author. E-mail: cuihangzheng@ecust.edu.cn
© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

究中广泛应用 (Leff 1996; Errampalli *et al*, 1998; Elvang *et al*, 2001; Pinheiro *et al*, 2008). 同时, 与 FISH、DGGE、real-time PCR 等生物技术相比较, GFP 检测更为方便, 能够较快捷地追踪检测绿色荧光蛋白标记菌株在环境中的行为 (Pinheiro *et al*, 2008; Campeb *et al*, 2010). 然而大多数构建的含绿色荧光蛋白基因的质粒不具有广泛适用性, 且标记的菌株不能够稳定遗传表达, 往往需要添加诱导物才能表达荧光, 因而在实际应用中不能够很好地发挥作用 (Errampalli *et al*, 1998; Elvang *et al*, 2001).

pTnMod系列质粒结合了 mini 转座子 (mini transposon) 稳定转座和质粒自我复制两方面的特点, 在革兰氏阴性细菌中具有很好的诱变功能 (Dennis *et al*, 1998). 将 GFP 插入到不同抗性的 pTnMod系列质粒中, 可以较容易地插入到待标记革兰氏阴性细菌的染色体 DNA 中, 实现遗传标记稳定遗传, 同时还可能筛选到与降解有关的基因.

因此, 本文通过构建具有不同抗性且能够组成型表达绿色荧光蛋白的一系列 pTnMod 转座子质

粒, 并将绿色荧光蛋白基因分别插入到多环芳烃降解菌株基因组内, 研究所获得的转化子在没有抗生素选择压力下连续传代多次后表达荧光蛋白的性能, 以期为进一步研究降解菌在多环芳烃污染环境中的存活能力及生态安全等提供参考.

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 菌株、质粒、培养基和主要试剂

本研究所用菌株、质粒和 PCR 引物如表 1 所示. KOD 酶、限制性内切酶 *Kpn*I 和 *Nsi*I、T₄ DNA 连接酶、*λ* DNA HindIII Marker Marker DL2000 等由大连宝生物工程公司 (Takara) 和华美生物工程公司提供. 氨苄青霉素 (Ampicillin, Ap)、硫酸卡那霉素 (Kanamycin Sulfate, Km)、氯霉素 (Chloramphenicol, Cm)、壮观霉素 (Spectinomycin, Sp)、庆大霉素 (Gentamicin, Gm)、四环素 (Tetracycline, Tc)、红霉素 (Erythromycin, Em) 和十六烷基三甲基溴化铵 (Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide, CTAB) 均购自华美生物工程有限公司.

表 1 菌株、质粒和 PCR 引物的特性
Table 1 Bacterial strains, plasmids and primers used in this study

菌株/质粒/引物	特性	来源
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>SupE</i> 44 <i>ΔlacU</i> 169 (80 <i>lacZ</i> ΔM 15) <i>hsdR</i> 17 <i>recA</i> 1 <i>endA</i> 1 <i>gyrA</i> 96 <i>thi</i> 1 <i>relA</i> 1	本实验室保存
<i>Pseudomonas</i> sp. 12A	能够分别降解苯、萘、蒽等污染物, Ap ^R	Cui <i>et al</i> , 2008
<i>Sphingomonas</i> sp. 12B	能够分别降解苯、萘、蒽等污染物, Ap ^R	Cui <i>et al</i> , 2008
<i>Pseudomonas</i> sp. 12AG	能够分别降解苯、萘、蒽等污染物, 含有 <i>gfp</i> 基因	本研究
<i>Sphingomonas</i> sp. 12BG	能够分别降解苯、萘、蒽等污染物, 含有 <i>gfp</i> 基因	本研究
pUC18	Ap ^R	本实验室保存
pCM18	Em ^R , PTRKL2-PCP25-RBSH-gfpmut3'-T0-T1	Hansen <i>et al</i> , 2001
pTnMod-OCm	Cm ^R	Dennis <i>et al</i> , 1998
pTnMod-OGm	Gm ^R	Dennis <i>et al</i> , 1998
pTnMod-OTc	Tc ^R	Dennis <i>et al</i> , 1998
pTnMod-OKm3	Km ^R	Dennis <i>et al</i> , 1998
pMD18-T	Ap ^R , 由 pUC18 酶切后添加“T”改建而成	购自 Takara 公司
pRK2013	Km ^R , 辅助质粒	中国农业大学惠赠
pUC18-18	Ap ^R , 在 pUC18 质粒 <i>EcoR</i> 插入 1.9 kb PCR18 片段	本研究
pTnMod-OGm-G	Gm ^R , 在 pTnMod-OGm 的 <i>Kpn</i> I 和 <i>Nsi</i> I 位点插入 1.9 kb PCR18 片段	本研究
pTnMod-OTc-G	Tc ^R , 在 pTnMod-OTc 的 <i>Kpn</i> I 和 <i>Nsi</i> I 位点插入 1.9 kb PCR18 片段	本研究
pTnMod-OKm3-G	Km ^R , 在 pTnMod-OKm3 的 <i>Kpn</i> I 位点插入 1.9 kb PCR18 片段	本研究
pTnMod-OCm-G	Cm ^R , 在 pTnMod-OCm 的 <i>Kpn</i> I 和 <i>Nsi</i> I 位点插入 1.9 kb PCR18 片段	本研究
Primers (5'-3')		
<i>gfp</i> 18 primer1	CGCATGCATATCGATTTCGAGATCTGCAGGATC	本研究
<i>gfp</i> 18 primer2	CTAGCTACCCCGGGGATCCGTCGACCTGC	本研究
<i>gfp</i> 18 primer3	CTAGCTACCATCGATTTCGATCTGCTGAGATC	本研究

注: Cm^R: chloramphenicol resistant; Em^R: erythromycin resistant; Ap^R: Ampicillin resistant; Km^R: Kanamycin Sulfate; Gm^R: Gentamicin; Tc^R: Tetracycline.

降解菌无机盐培养基 (Mineral Salt Medium, MSM)参考文献 (Cui *et al.*, 2008)方法配制. LB 培养基: 10 g NaCl 10 g 蛋白胨, 5 g 酵母粉, 加水至 1000 mL, pH = 7.2

2.2 绿色荧光蛋白转座子质粒的构建

质粒的提取、转化、限制性酶切、凝胶电泳以及 DNA 连接方法参见《分子克隆实验指南 (第 3 版)》

用 *EcoRI* 酶切质粒 pCM18 回收约 1.9 kb 的片段, 命名为 PCR18 将该片段连接到 pUC18 载体中构建 pUC18-18 质粒, 送上海联合基因公司测序, 根据测序结果, 设计引物 gfp18 primer1 和 gfp18 primer2 (或 gfp18 primer3) (表 1). 以 pCM18 质粒 (Hansen *et al.*, 2001) 为模板, PCR 扩增体系为: 10 × KOD buffer 5 μL, dNTPs 5 μL, MgSO₄ 2 μL, gfp18 primer1 1 μL, gfp18 primer2 (或 gfp18 primer3) 1 μL, pCM18 质粒 0.5 μL, KOD 酶 1 μL, 水 34.5 μL. PCR 扩增条件如下: 98℃ 5 min, 98℃ 30 s, 60℃ 30 s, 74℃ 40 s, 共 25 个循环, 74℃ 10 min. PCR 产物经回收纯化后, 分别与含不同抗性基因的 pTrnMod-OCm、pTrnMod-OGm、pTrnMod-OKm3 和 pTrnMod-OTc 载体连接后, 转化至 *Escherichia coli* DH5α.

2.3 荧光标记

利用三亲本杂交方法 (Triparental mating) 分别对菌降解菌 *Sphingomonas* sp. 12A 或 *Pseudomonas* sp. 12B 进行 GFP 标记 (Dennis *et al.*, 1998). 具体步骤为: 分别挑取供体菌 *E. coli* (pTrnMod-OGm-G)、辅助菌 *E. coli* (pRK2013) 和受体菌 (*Sphingomonas* sp. 12A 或 *Pseudomonas* sp. 12B) 单菌落, 接种到相应的抗生素 LB 液体培养基中, 37℃ 培养过夜; 按 1% 接种量, 将上述 3 株菌转接到相应的抗生素 LB 液体培养基中, 培养 5~8 h 至对数中期; 分别取供体菌、辅助菌和受体菌 500 μL 加到同一离心管中混合, 室温下 2500g 低速离心, 收集菌体; 用液体 LB 或无菌水洗涤菌体 2~3 次, 并用 100 μL LB 培养基重悬菌体; 将混合菌液全部转移到预先置于 LB 平板上的无菌滤膜中央, 30℃ 倒置培养 12~18 h, 用 LB 洗下滤膜上的菌体, 制成菌悬液, 稀释涂布在 Gm (50 μg·L⁻¹) 和 Ap (100 μg·L⁻¹) 的双抗 LB 平板上, 并以受体菌为对照, 30℃ 培养 16~30 h, 挑取双抗平板上有荧光的单菌落, 进一步鉴定.

2.4 荧光检测

显微镜: Olympus IX-51, Olympus CCD (charge-

coupled device) 相机, 图片处理软件为 Software IPP 6.0 观察绿色荧光用蓝光激发.

2.5 降解实验

取 50 μL 浓度为 10 g·L⁻¹ 的二氯甲烷溶解菌的母液加入到 50 mL 的锥形瓶中, 待二氯甲烷完全挥发, 加入 20 mL MSM (Cui *et al.*, 2008). 将经过以菌为唯一碳源预培养并经过 MSM 洗涤的降解菌浓缩至约 10⁸ CFU·mL⁻¹, 并取 15 μL 加入到菌的降解体系中, 摇床转速和温度分别为 200 r·min⁻¹ 和 30℃, 避光培养 18 d, 分析菌的浓度.

2.6 菌的分析

利用 Shimadzu LC-10ATVP 型 HPLC (Shimadzu Japan) 分析菌的浓度, 其检测器为 Shimadzu SPD-10AVP (UV-V is). 色谱柱: Shimadzu ODS-C18 (4.6 mm × 250 mm); 流动相: V (甲醇): V (水) = 80:20; 流速: 0.5 mL·min⁻¹; 检测波长: 254 nm; 进样量: 10 μL.

3 结果 (Results)

3.1 质粒的构建

用 *EcoRI* 酶切质粒 pCM18 回收约 1.9 kb 的片段, 测序后命名为 PCR18, 该片段含有 CP25 组成型强启动子 (Jensen *et al.*, 1998)、gfpmuta3 阅读框和 T₀~T₁ 增强型转录终止子 (Andersen *et al.*, 1998), 其序列如图 1 所示.

根据上述序列设计引物 gfp18 primer1 和 gfp18 primer2 (表 1), PCR 扩增该片段, 连接到 pTrnMod-OGm 的 *KpnI* 和 *NsiI* 位点构建质粒 pTrnMod-OGm-G (图 2), 该质粒的构建及鉴定结果如图 3 所示.

利用相同的方法构建 pTrnMod-OCm-G、pTrnMod-OTc-G 质粒. 由于质粒 pTrnMod-OKm3 含有 2 个 *NsiI* 的酶切位点, 因此, PCR 扩增用 gfp18 primer1 和 gfp18 primer3 将所构建的质粒 pTrnMod-OCm-G、pTrnMod-OGm-G、pTrnMod-OTc-G 和 pTrnMod-OKm3-G 分别转化至 *Escherichia coli* DH5α, 均能够观察到明显的绿色荧光蛋白表达.

3.2 *Sphingomonas* sp. 12A 和 *Pseudomonas* sp. 12B 的绿色荧光标记

研究发现 *Sphingomonas* sp. 12A 和 *Pseudomonas* sp. 12B 均对庆大霉素 (Gm) 敏感. 同时, 利用三亲本杂交方法可成功地将 pTrnMod-OGm-G 分别转入受体菌 *Sphingomonas* sp. 12A 和 *Pseudomonas* sp. 12B 中, 在双抗平板上能够观察到有绿色荧光的转化子

<i>EcoRI</i>	
1	<u>GAATTCATCG</u> ATTGAGATC TGCAGGATCC CATTATGCTT TGGCAGTTTA TTCTTTGACAT
CP26 Promoter	
61	GTAGTGAGGG GGCCTGGTATA ATCAACATAGT ACTGTTCCGG ATCCCTAAGA ATGGGCTAG
M R K K G E E L F T G V V P	
121	AATTAAAGAG GAGAAATTAA GCATGCGTAA AGGAGAAGAA CTTTCACTG GAGTTGTCC
I L V E L D G D V N G H K F S V S G E G	
181	AATTCTTGTT GAATTAGATG GTGATGTTAA TGGGCACAAA TTTCTGTCA GTGGAGAGGG
E G D A T Y G K L T L K F I C T T G K L	
241	TGAAGGTGAT GCAACATACG GAAACTTAC CCTTAAATTT ATTGCACTA CTGGAAAACT
P V P W P T L V T T F G Y G V Q C F A R	
301	ACCTGTTCOA TGGCCAACAC TTGTCACTAC TTTGCTTAA TGGTTCATG GCTTTGCGAG
Y P D H M K Q H D F F K S A M P E G Y V	
361	ATACCCAGAT CATATGAAAC AGCATGACTT TTTCAAGAGT GCATGCGCG AAGGTTATGT
Q E R T I F F K D D G N Y K T R A E V K	
421	ACAGGAAAGA ACTATATTTT TCAAGATGA CGGGAACATC AAGACACGTG CTGAAGTCAA
F E G D T L V N R I E L K G I D F K E D	
481	GTTTGAAGST GATACCCCTG TTAATAGAAT CGAGTTAAAA GGTATTGATT TTAAGAAGA
G N I L G H K L E Y N Y N S H N V Y I M	
541	TGGAACATTT CTGTGACACA AATTGGAATA CAACATAAC TCACACAATG TATACATCAT
A D K Q K N G I K V N F K I R H N I E D	
601	GGCAGACAAA CAAAAGATG GAATCAAAAT TAACCTCAAA ATTAGACACA ACATTGAAGA
S S V Q L A D H Y Q Q N T P I S D G P V	
661	TGGAAGCGTT CAACATGACG ACCATTATCA ACAAAATACT CCAATTGGCG ATGGCCCTGT
L L P D N H Y L S T Q S A L S K D P N E	
721	CCTTTTACCA GACAACCAAT ACCTGTCCAC ACAATCTGCC CTTTCGAAAG ATCCCAACGA
K R D H M V L L E F V T A A G I T H G M	
781	AAAGAGAGAC CACATGCTCC TTCTTGAGTT TGTAACAGCT GCTGGGATTA CACATGGCAT
D E L Y K *	
841	GGATGAACTA TACAAATAAG CTTAATTAGC TGAGCTTGA CTCCTGTTGA TAGATCCAGT

Lambda T0 transcriptional termination region	
901	AATGACCTCA GAATCCATC TGGATTGTGT CAGAACGCTC GGTTCGCCGC GGGCGTTTTT
TATTTGGTGAG AATCCAAGCT AGCTTGGCGA GATTTTCAGG AGCTAAGGAA GCTAAAAATGG	
961	AGAAAAAAT CACTGGATAT AOCACCGTTG ATATATCCCA ATGGCATCGT AAAGAACATT
1021	TTGAGGCATT TCAGTCAGTT GCTCAATGTA CCTATAACCA GACCGTTCAG CTGGATATTA
1081	CGGCCCTTTT AAAGACCGTA AAGAAAAATA AGCACAAGTT TTATCCGGCC TTTATTACACA
1141	TTCTTGCCCG CTTGATGAAT GCTCATCCGG AATTTCGTAT GGCAATGAAA GACGGTGAGC
1201	TGTTGATATG GGATAGTGTT CACCCCTGTT ACACCGTTTT CCATGAGCAA ACTGAAACGT
1261	TTTCATCGCT CTGGAGTGAA TACCAACGAC ATTTCGGCCA GTTCTACAC ATATATTGCG
1321	AAGATGTGCG GTGTACGGT GAAAACCTGG CCTATTTCOC TAAAGGGTTT ATTGAGAATA
1381	TGTTTTTCGT CTCAGCCAA TCCCTGGGTGA GTTTCACCAG TTTTGATTTA AACGTGGCCA
1441	ATATGGACAA CTCTTTCGCG CCGTTTTCAC CCATGGGCAA ATATTATACG CAAGGOGACA
1501	AGGTGCTGAT GCGCGTGGCG ATTTCAGGTC ATCATGCCCT TTGTGATGGC TTCCATGTGG
1561	GCAGAATGCT TAATGAATTA CAACAGTACT GCGATGAGTG GCAGGGCGGG GCGTAATTTT
1621	TTTAAGGCAG TTATTGCTGC CTTTAAACGC CTGGGGTAAT GACTCTCTAG CTTGAGGCAT
rMB T1 transcriptional termination region	
1681	CAATAAAAC GAAAGGCTCA GTGCAAGAGC TGGGCTTTTC GTTTTATCTG TTGTTTGTGG
1741	GTGAAGGCTC TCCTGAGTAG GACAAATCCG CCGCTAGGAG CTTGCGGCCA TCTAGATCTC
1801	GAGCTCGCGA AAGCTTTGGCT GCAGGCTGAC GGATCCCGCG <i>EcoRI</i>
1861	<u>GAATTC</u>

图 1 PCR18 的序列
Fig 1 Nucleotide sequence of PCR18

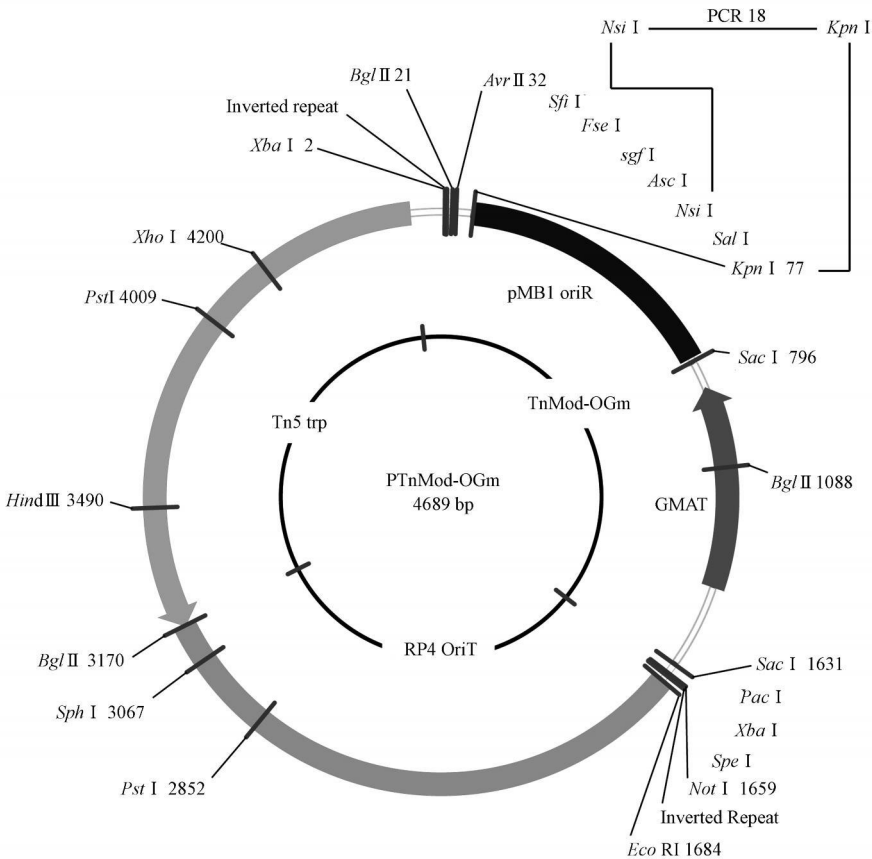


图 2 pTnMod-OGm 及 pTnMod-OGm-G 图谱
Fig 2 Physical map of pTnMod-OGm and pTnMod-OGm-G

菌落。试验过程中分别挑选 3 个荧光强烈的转化子，发现其均能够在以葱为唯一碳源的无机盐培养基中很好地生长。各挑选一个转化子分别将其命名为 *Sphingomonas* sp. 12AG 和 *Pseudomonas* sp. 12BG，并

利用荧光倒置显微镜观察其荧光,结果如图 4所示.

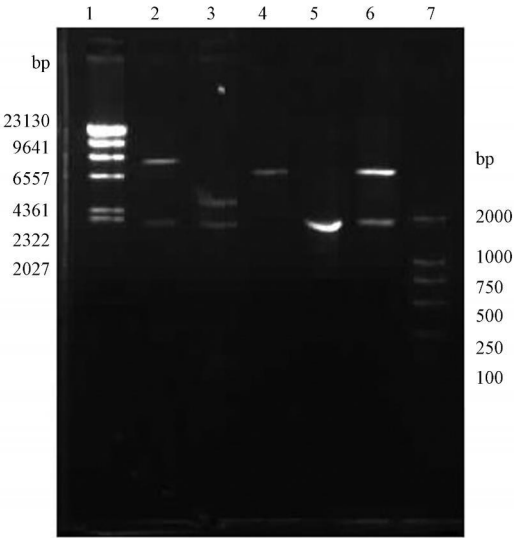


图 3 pTrnM αd-OCm-G 的构建及鉴定 (1 λDNA HindIII Marker 2 pCM 18/EcoRI 3 pUC18-18/EcoRI 4 pTrnM αd-OCm/KpnI + NsiI 5 PCR 18 产物 6 pTrnM αd-OCm-G/KpnI + NsiI)

Fig 3 Construction and verification of pTrnM αd-OCm-G plasmid (1 λDNA HindIII Marker 2 pCM 18/EcoRI 3 pUC18-18/EcoRI 4 pTrnM αd-OCm/KpnI + NsiI 5 PCR 18 products 6 pTrnM αd-OCm-G/KpnI + NsiI 7. DL2000 Marker)

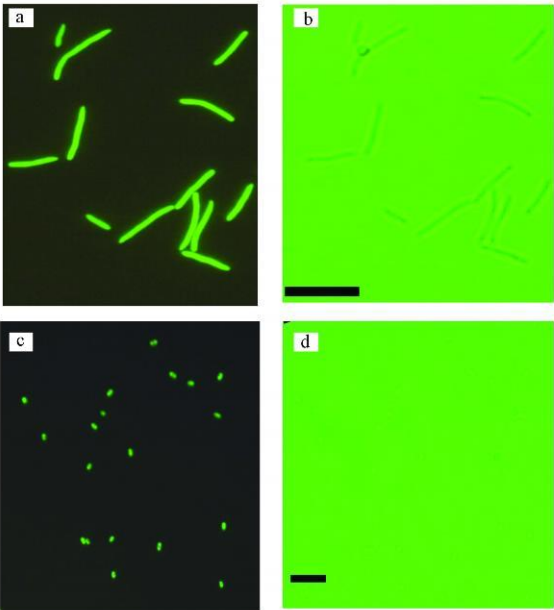


图 4 *Sphingomonas* sp 12AG (a b) 和 *Pseudomonas* sp 12BG (c d)的蓝光激发 (左)和明场 (右)观察结果 (Bar= 10 μm)

Fig 4 Merged epifluorescence micrograph (Light) and observed under the light field (Right) of *Sphingomonas* sp 12AG (a b) and *Pseudomonas* sp 12BG (c d)

3 3 *Sphingomonas* sp 12AG 和 *Pseudomonas* sp 12BG的鉴定

利用碱性裂解和 CTAB 方法分别提取转化子 *Sphingomonas* sp 12AG 和 *Pseudomonas* sp 12BG 的质粒和染色体 DNA. 结果发现, 从转化子中均没有提取到质粒, 推测含 *gfp* 基因的片段可能已插入到染色体 DNA 中. 利用 PCR 方法可以从转化子基因组 DNA 中成功扩增出特异性很强的预期片段 (图 5), 并且经测序后证实为 *gfp* 基因片段.

将转化子 *Sphingomonas* sp 12AG 和 *Pseudomonas* sp 12BG 在没有抗生素选择压力的无机盐培养基

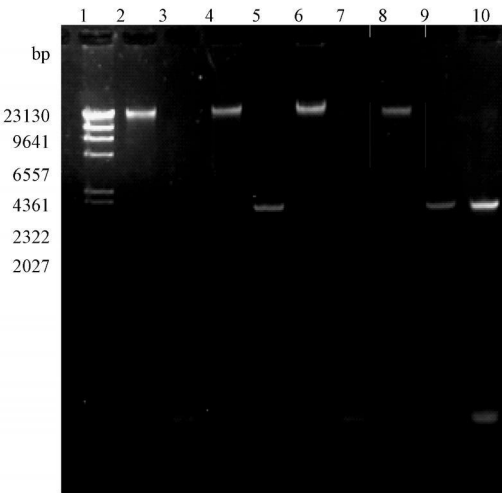


图 5 PCR 鉴定转化子 (1 λDNA HindIII Marker 2 *Sphingomonas* sp 12 基因组 DNA, 3 以 *Sphingomonas* sp 12 基因组 DNA 为模板扩增 PCR 18 产物, 4 *Sphingomonas* sp 12AG 基因组 DNA, 5 以 *Sphingomonas* sp 12AG 基因组 DNA 为模板扩增 PCR 18 产物, 6 *Pseudomonas* sp 12B 基因组 DNA, 7 以 *Pseudomonas* sp 12B 基因组 DNA 为模板扩增 PCR 18 产物, 8 *Pseudomonas* sp 12BG 基因组 DNA, 9 以 *Pseudomonas* sp 12BG 基因组 DNA 为模板扩增 PCR 18 产物, 10 以 pCM 18 质粒为模板扩增 PCR 18 产物)

Fig 5 Verification of recombinant plasmid by colony PCR (1 λDNA HindIII Marker 2 Genome DNA of *Sphingomonas* sp 12A; 3 Genome DNA of *Sphingomonas* sp 12A as template to amplify PCR 18 products 4 Genome DNA of *Sphingomonas* sp 12AG; 5 Genome DNA of *Sphingomonas* sp 12AG as template to amplify PCR 18 products 6 Genome DNA of *Pseudomonas* sp 12B; 7 Genome DNA of *Pseudomonas* sp 12B as template to amplify PCR 18 products 8 Genome DNA of *Pseudomonas* sp 12BG; 9 Genome DNA of *Pseudomonas* sp 12BG as template to amplify PCR 18 products 10. Plasmid DNA of pCM 18 as template to amplify PCR 18 products)

(葱为唯一碳源)中连续传代 20 次, 仍能够观察到强烈的绿色荧光, 说明插入到染色体上的遗传标记与质粒标记相比, 具有更稳定遗传的优点, 并没有明显影响其降解功能。

组成型 CP25 启动子在 *E. coli* *Pseudomonas* sp. 和 *Sphingomonas* sp. 等不同属的革兰氏阴性细菌中具有强启动活性 (Hansen *et al.*, 2001), 构建的一系列转座子质粒同时能够满足对不同抗性的需求并容易插入到革兰氏阴性菌的染色体 DNA 中, 可实现稳定遗传标记。这为今后的绿色荧光蛋白遗传标记和生态安全评价研究提供了很好的平台。

3.4 *Sphingomonas* sp. 12AG 和 *Pseudomonas* sp. 12BG 降解葱的特性

在以 25 mg L^{-1} 的固体葱为唯一碳源的降解体系中, 分别加入 *Sphingomonas* sp. 12AG 和 *Pseudomonas* sp. 12BG 使其终浓度约为 $2 \times 10^4 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 以不加菌体的含相同浓度固体葱的无机盐培养基作为对照。降解 18d 后, 利用 Reverse-HPLC 分析各菌的降解能力, 结果显示, *Sphingomonas* sp. 12AG 和 *Pseudomonas* sp. 12BG 分别能够在 18d 内将初始浓度为 25 mg L^{-1} 的固体葱降解 34% 和 32%, 与标记前 *Sphingomonas* sp. 12A 和 *Pseudomonas* sp. 12B 菌株 35% 和 34% 的降解率相比 (Cui *et al.*, 2008), 降解能力没有明显变化。

4 讨论 (Discussion)

绿色荧光蛋白具有荧光特性稳定、对细胞安全等优点, 使其在微生物定殖、微生物动态检测等研究中备受关注。然而报道中所构建质粒的荧光蛋白表达通常需要添加诱导物, 不利于实时监测 (Campelo *et al.*, 2010); 且荧光蛋白基因没有插入到染色体中, 经过多次传代造成质粒丢失, 容易引起监测数据不准确 (Hansen *et al.*, 2001); 同时, 由于抗性和转化效率等原因, 所构建的质粒对其它宿主菌株不具有通用性, 从而限制了该报告基因在其它宿主中的广泛使用 (Elvang *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2008)。因此, 构建具有广泛宿主且能够稳定遗传和易转化的质粒是对微生物进行追踪监测的前提。

本研究所构建的组成型 CP25 启动子能够在 *E. coli* *Pseudomonas* sp. 和 *Sphingomonas* sp. 等不同属的细菌中具有强启动活性, 便于实时监测。同时, GFP 标记菌株 *Sphingomonas* sp. 12AG 和 *Pseudomonas*

sp. 12BG 仍具有降解多环芳烃的特性, 且遗传标记前后菌株的降解能力没有明显差异, 但有关 *gfp* 基因插入到标记菌株染色体基因组的具体位置还需进一步研究。本文所构建的一系列转座子质粒能够同时满足对不同抗性的需求, 并容易插入到革兰氏阴性菌的染色体 DNA 中, 实现稳定遗传。这为以后从事遗传标记研究和生态安全评价提供了很好的平台。

5 结论 (Conclusions)

1) 构建了分别含有氯霉素 (Gm)、四环素 (Tc)、硫酸卡那霉素 (Km) 和庆大霉素 (Gm) 4 种不同抗性基因的一系列转座子质粒 pTrnMod-OCm-G、pTrnMod-OTc-G、pTrnMod-OKm3-G 和 pTrnMod-OGm-G, 且它们均能够在不同属的革兰氏阴性细菌中组成型表达绿色荧光蛋白。

2) 通过三亲本杂交的方法, 较容易实现对革兰氏阴性高效降解菌株的绿色荧光蛋白标记, 为进一步研究降解细菌在环境中的存活能力和生态安全奠定了基础。

3) 成功地将绿色荧光蛋白基因分别插入到多环芳烃降解菌株 *Sphingomonas* sp. 12A 和 *Pseudomonas* sp. 12B 的基因组内, 获得具有降解多环芳烃的特性, 同时在没有抗生素选择压力下连续传代多次仍能够稳定组成型表达绿色荧光的突变子。

责任作者简介: 崔长征 (1978—), 男, 助理研究员, 研究方向为持久性有机污染物的生物降解。E-mail: cuizhangzheng@ecust.edu.cn

参考文献:

- Andersen J B, Stenberg C, Poulsen L K, *et al.* 1998. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria [J]. *Appl Environ Microbiol* 64: 2240-2246.
- Campelo A B, Rodriguez A, Martinez B. 2010. Use of Green fluorescent protein to monitor cell envelope stress in *Lactococcus lactis* [J]. *Appl Environ Microbiol* 76: 978-981.
- Cui C Z, Chi Z, Xia W, *et al.* 2008. Effect of rhamnolipids on degradation of anthracene by two newly isolated strains *Sphingomonas* sp. 12A and *Pseudomonas* sp. 12B [J]. *Journal of Microbiology Biotechnology* 18: 63-66.
- Dennis J J, Zylstra G J. 1998. Plasmid modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes [J]. *Appl Environ Microbiol* 64: 2710-2715.
- Elvang A M, Westenberg K, Jernberg C, *et al.* 2001. Use of green

- fluorescent protein and luciferase biomarkers to monitor survival and activity of *Aerobacter chrophenolicus* A6 cells during degradation of 4-chlorophenol in soil [J]. *Environmental Microbiology* 3: 32-42
- Errampalli D, Okamura H, Lee H, *et al* 1998. Green fluorescent protein as a marker to monitor survival of phenanthrene-mineralizing *Pseudomonas* sp. UG14G in creosote-contaminated soil [J]. *FEMS Microbiology Ecology* 26: 181-191
- Heinani E, Merimaa M, Viggor S *et al* 2005. Biodegradation efficiency of Functionally important populations selected for bioaugmentation in phenol- and oil-polluted area [J]. *FEMS Microbiol Ecol* 51: 363-373
- Jensen P R, Hammer K 1998. The sequence of spacers between the consensus sequences modulates the strength of prokaryotic promoters [J]. *Appl Environ Microbiol* 64: 82-87
- Leff L G, Leff A A 1996. Use of green fluorescent protein to monitor survival of genetically engineered bacteria in aquatic environments [J]. *Appl Environ Microbiol* 62: 3486-3488
- Mohan S V, Kisa T, Ohkuma T, *et al* 2006. Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency [J]. *Rev Environ Sci Biotechnol* 5: 347-374
- Molin S, Hansen M C, Palmer R J Jr *et al* 2001. Assessment of GFP fluorescence in cells of *Streptococcus gordonii* under conditions of low pH and low oxygen concentration [J]. *Microbiology* 147: 1383-1391
- Pinheiro L B, Gibbs M D, Vesey G, *et al* 2008. Fluorescent reference strains of bacteria by chromosomal integration of a modified green fluorescent protein gene [J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 77: 1287-1295
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T 2003. *Molecular Cloning* (3rd Edition) [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 27-627
- Tang Y, Qi J L, Krieger-Brockett B 2005. Evaluating factors that influence microbial phenanthrene biodegradation rates by regression with categorical variables [J]. *Chemosphere* 59: 729-741
- Tresse O, Errampalli D, Kostzynska M, *et al* 1998. Green fluorescent protein as a visual marker in a p-nitrophenol degrading *Moraxella* sp. [J]. *FEMS Microbiology Letters* 164: 187-193