

研究报告

假单胞菌 XN-1 硝基苯降解性质粒的提取及研究

刘 春 周集体 黄丽萍 吕 红

(大连理工大学环境科学与工程学院 大连 116012)

摘要: 假单胞菌 XN-1 对有机污染物硝基苯具有降解性, 并且对氨苄青霉素具有抗性。检测和提取了假单胞菌 XN-1 细胞内的质粒, 得到了一个约 22kb 大小的质粒 pXN-1。质粒消除实验证实这个质粒与硝基苯降解性有关, 而与抗生素抗性无关。XN-1 和其自发突变株 XN-12 和 XN-13 特性的差异和质粒检测的差异之间存在对应关系, 并且得到了一个比 pXN-1 几个 kb 的衍生质粒 pXN-13。

关键词: 假单胞菌 XN-1, 突变株, 质粒, 硝基苯降解

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 01-0001-04

THE ISOLATION AND RESEARCH OF NITROBENZENE DEGRADATIVE
PLASMID FROM *PSEUDOMONAS* XN-1

LIU Chun ZHOU Ji-Ti HUANG Li-Ping LU Hong

(School of Environ Sci& Eng, Dalian Univ of Technol, Dalian 116012)

Abstract: *Pseudomonas* XN-1 has the ability of degradation for organic pollutant nitrobenzene, and the resistance to ampicillin. In this paper, the plasmid was detected and isolated from the cell of *Pseudomonas* XN-1, and plasmid pXN-1 whose size is about 22 kb was gained. The experiment of plasmid elimination confirmed that the plasmid has some relation to the ability of nitrobenzene degradation, while it is irrelevant to the resistance to ampicillin. The feature difference between XN-1 and its spontaneous mutants was corresponding to the difference of the plasmids detection, and a derivative plasmid pXN-13 was obtained from mutant XN-13 which is a few kb smaller than pXN-1.

Key words: *Pseudomonas* XN-1, Plasmids, Mutants, Nitrobenzene degradation

对于很多有机污染物降解菌来说, 污染物降解的特性都是由菌体细胞内的质粒控制的, 或者与质粒有关。所以, 对于降解菌质粒及位于质粒上的基因和有机物降解特性之间的关系的认识, 将有助于我们更深刻的了解微生物对有机污染物降解的内在机制和过程。硝基苯是一种常见的有机污染物, 国内外对硝基苯的微生物降解进行较为广泛的研究, 对于其降解途径和机理都有了比较详尽的了解^[1-4], 但是对于硝基苯降解性质粒的报道还没有见到。本文报道了对硝基苯具有降解性的假单胞菌 XN-1 及其突变株细胞质粒的提取及对硝基苯降解的影响。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

本实验室筛选得到的对硝基苯具有降解性的假单胞菌 XN-1。

收稿日期: 2001-12-26, 修回日期: 2002-04-18

1.2 抗生素抗性检测

选取 3 种不同的抗生素: 氨苄青霉素, 四环素, 氯霉素, 在 LB 培养基中加入不同浓度的这 3 种抗生素, 铺成平板, 考察菌株在平板上的生长情况, 已确定是否对抗生素存在抗性。

1.3 质粒提取

细胞质粒的提取分别采用了碱裂解法, QIAGEN 试剂盒和 SDS 裂解法^[5]。

1.4 质粒检测^[6]

对细胞内质粒的检测采用如下方法: (1) 3mL LB 菌液培养过夜, 7,000 r/min, 4℃ 离心 10min; (2) 重悬于 1mL TE 缓冲液终 (40mmol/L Tris-乙酸, 2mmol/L EDTA, 用冰乙酸调整 pH 值为 7.9); (3) 加入 2mL 裂解液 (3% SDS, 50mmol/L Tris, 加 1.6mL 2N NaOH 调整 pH 为 12.6) 裂解, 轻摇混匀; (4) 在 50℃ ~ 65℃ 的水浴中加热 20min, 然后加入 2 体积的氯仿; (5) 轻轻振荡乳化, 离心破乳 (6,000 r/min, 15min, 4℃); (6) 上相可直接进行电泳分析。

1.5 质粒消除

细胞质粒消除的实验方法见文献 [7]。

1.6 琼脂糖电泳分析

琼脂糖浓度为 0.8%, 电泳电压为 100V, marker 为 λ DNA/*Hind* III, 采用 UVP 凝胶成像仪分析电泳结果。

2 结果与讨论

表 1 假单胞菌 XN-1 对抗生素的抗性

抗生素	氨苄青霉素	四环素	氯霉素
浓度 (μ g/mL)	50 100	25	50 100
生长情况	良好 良好	不生长	不生长 不生长

2.1 XN-1 对抗生素的抗性

对假单胞菌 XN-1 抗生素抗性的实验结果表明, 该菌株对氨苄青霉素有抗性, 而对四环素和氯霉素没有抗性, 如表 1 所示。

2.2 细胞质粒的检测

应用质粒检测的方法对假单胞菌 XN-1 体细胞进行质粒检测, 结果得到了一条比较明显的质粒带, 如图 1 所示。

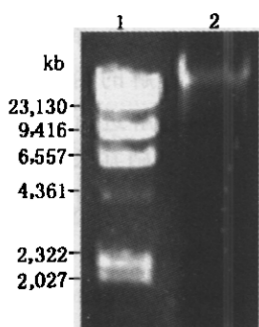


图 1 *Pseudomonas* XN-1 质粒检测结果

1 marker, 2 检测到的

2.3 细胞质粒的提取

采用碱裂解法和试剂盒对细胞进行质粒提取, 得到了非常相似的结果, 如图 2 所示。采用 SDS 裂解法提取结果如图 3 所示。

造成这两种提取结果的原因是由于细胞中的质粒比较大。一般来讲, 如果降解菌种存在降解性质粒的话, 那么这个质粒通常都是比较大的, 从几十到上百 kb 不等^[8,9], 法和试剂盒法提取过程中, 反应条件比较剧烈, 在操作过程中容易造成大质粒或染色体的破碎, 所以呈现出图示的情况; SDS 法是相对比较温和的质粒提取方法, 适合于大质粒的提取, 因而能得到比较满意的结果, 所得到的质粒带与检测到的质粒带一致, 这个质

粒的大小约为 22kb。

2.4 质粒消除

采用吡啶橙法对菌体细胞进行质粒消除，并对质粒消除后的菌体细胞对硝基苯降解性和抗生素抗性进行检验，以确定质粒与这些特性之间是否有关系，方法如下：挑单菌落于 3mL LB 培养基（含氨苄 50 μ g/mL）中，30 $^{\circ}$ C 摇床过夜培养，然后取 200 μ L 菌液，接入 5mL LB 培养基（含吡啶橙 75mg/L），30 $^{\circ}$ C 摇床培养 24h，然后稀释后，涂布至以下 4 个平板：（1）LB 平板；（2）LB 平板（含氨苄 50 μ g/mL）；（3）LB 平板（含硝基苯 100mg/L）；（4）LB 平板（含氨苄 50 μ g/mL 和硝基苯 100mg/L），培养 2~3d，检查菌落在平板上的生长情况。

经过质粒消除之后的菌体在平板（1）上生长正常，在平板（2）上同样生长良好，未受影响，而在平板（3）、（4）上基本没有生长，受到明显的抑制。对质粒消除前后的菌体细胞进行质粒检测，结果如图 4 所示，质粒消除前检测到的质粒带，在质粒消除之后就检测不到了，说明质粒消除前后菌株性状的变化与这个质粒是有关系的。

因此这个结果表明，抗生素的抗性与这个质粒没有关系，可能是由染色体编码的，而硝基苯的降解则与这个质粒有关，受这个质粒的控制。

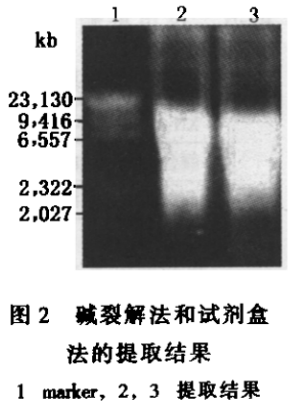


图 2 碱裂解法和试剂盒法的提取结果
1 marker, 2, 3 提取结果

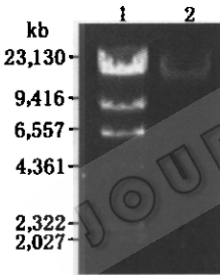


图 3 SDS 裂解法提取结果
1 marker, 2 提取结果

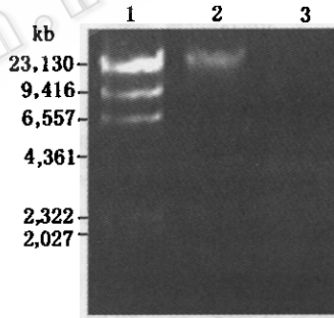


图 4 质粒消除后的质粒检测结果
1 marker, 2 质粒未消除, 3 质粒消除后

2.5 XN-1 与其突变株之间特性和质粒关系的比较

有报道表明^[10]，菌株质粒在环境的诱导下，会自发的突变，这种突变往往会给菌株的菌落带来微小的变化。因此，通过在选择性平板上寻找个别存在细小差异的菌落，就可能得到菌株的自发突变株。在实验中，从含有氨苄和硝基苯的平板上得到了两个略有差异的菌落，分别命名为 XN-12 和 XN-13，并对其进行了研究。3 种菌株菌落的主要差异如表 2 所示。

3 种菌株在选择培养基（含氨苄和硝基苯）中的生长情况如表 3 所示。对这 3 种菌株进行质粒检测，得到的结果如图 5 所示。

由图 5 可以看到，在菌的生长量基本相同的情况下，突变株 XN-13 质粒带的浓度要比 XN-1 略大，而突变株 XN-12 则基本检测不到质粒。这一方面进一步说明了质粒与降解性的相关性，同时也表明突变株 XN-13 的质粒拷贝数可能比 XN-1 要多，而 XN-12 则可能出现了质粒丢失的现象。用 SDS 裂解法提取 XN-13 的细胞质粒，得到的结果如图 6 所示，可以看到，从 XN-13 中提取的质粒带位置与 XN-1 大体一致，但是并不完全

相同, XN-13 比 XN-1 在质粒大小上要小几个 kb, 这种突变株质粒片段的缺失也曾有过报道, 这里推测这种质粒拷贝数的变化可能与质粒中某一片段的缺失有关。

表 2 XN-1 与其突变株的菌落差异

XN-1	XN-12	XN-13
颜色	乳白	橙红 乳白
表面特征	光滑	光滑 干涩

表 3 XN-1 与其突变株在选择培养基上的生长比较

	XN-1	XN-12	XN-13
平板培养	正常	缓慢, 受抑制	加快
液体培养	正常	缓慢, 受抑制	加快

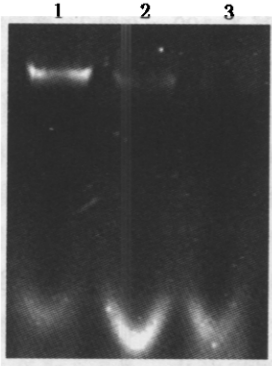


图 5 XN-1 及其突变株质粒检测的结果

1 XN-13, 2 XN-1, 3 XN-13

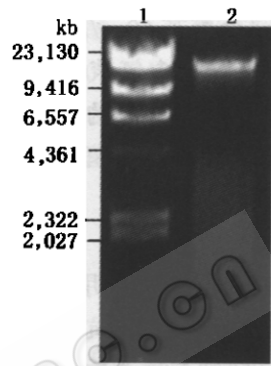


图 6 XN-13 质粒提取结果

1 marker, 2 XN-13

有关这个质粒及其上面的基因片段与降解过程的确切关系, 和突变株之间质粒的差异等问题有待于进一步研究。

3 结论

(1) 硝基苯降解菌假单胞菌 XN-1 对氨苄青霉素有抗性。

(2) 质粒检测和 SDS 裂解法都从 XN-1 中得到一个大小约为 22kb 的质粒, 质粒消除实验证实这个质粒与硝基苯降解有关, 而与抗生素抗性无关。

(3) XN-1 与其突变株之间的性状的差异与它们质粒的差异变化有关。

参考文献

- [1] 刘红果. 环境科学与技术, 1991, (1): 16~17.
- [2] 侯 铁, 任 源, 韦朝海. 环境科学研究, 1999, 12 (6): 25~27.
- [3] Nishino S F. Nishino Appl Environ Microbiol, 1993, 59 (8): 2520~2525.
- [4] Zhong Q H. Appl Environ Microbiol, 1997, 63 (12): 4839~4843.
- [5] J. 萨姆布鲁克等. 分子克隆实验指南 (第二版). 科学出版社, 1999.
- [6] Kado C I, Liu S T. J Bacterial, 1981, 145 (3): 1365~1373.
- [7] 王春生, 罗清修, 简浩然. 环境科学学报, 1984, (4): 325~332.
- [8] Shields M S. Appl Environ Microbiol, 1995, 61 (4): 1352~1356.
- [9] Mae AA, Marits R O, Ausmees N R. Journal of General Microbiology, 1993, 139: 3165~3170.
- [10] Tardif Gand Greer C W. Appl Environ Microbiol, 1991, 57 (6): 1853~1857.