

转座子标签法突变呋喃丹降解菌 CFDS-1 *

徐剑宏 洪 青 汪 婷 张小华 李顺鹏 **

(南京农业大学农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

摘要: 通过接合使供体大肠杆菌 DH5 α 中的质粒 pSC123 上的转座子插入到受体菌 CFDS-1 基因组 DNA 中, 以引起该菌株的基因插入突变。利用转座子上的卡那霉素抗性基因和呋喃丹降解过程中红色物质的产生与否初步筛选出 6 株突变株, 分别命名为 CFDS-M1 ~ CFDS-M6。紫外扫描和气谱检测结果进一步证明这些突变子确实失去了对呋喃丹的降解能力。根据转座子的序列设计引物, 以 6 株突变株的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 并对 PCR 产物进行限制性酶切分析, 结果表明这些突变子中呋喃丹降解基因的失活就是由于转座子的插入而导致的。

关键词: 呋喃丹, 转座子标签法, 降解, 突变

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 02-0034-05

Screening of Mutants of Carbofuran Degrading Bacterium CFDS-1 by Transposon Tagging *

XU Jian-Hong HONG Qing WANG Ting ZHANG Xiao-Hua LI Shun-Peng **

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

Abstract: In order to mutate a carbofuran degrading strain CFDS-1, transposon of pSC123 was introduced into the genomic DNA of strain CFDS-1 by conjugation with *E. coli* DH5 α (pSC123) as donor and strain CFDS-1 as recipient, 6 mutants which lost carbofuran degrading ability were obtained with a kanamycin resistant gene in the middle of transposon and the disappearance of a red compound during the degrading of carbofuran as preliminary selecting marks, they were designated as CFDS-M1 ~ CFDS-M6. UV scanning and GS assay results also proved their mutations. PCR was carried out respectively with primers designed according to the sequence of transposon and genomic DNA of 6 mutants as templates, restriction analysis of PCR products showed that the mutation of carbofuran degrading genes of these mutants was caused by transposon insertion.

Key words: Carbofuran, Transposon tagging, Degrading, Mutate

细菌突变的方法有很多, 如物理方法: 紫外线诱变法^[1]、人工闪电法^[2]、⁶⁰Co 射线照射法^[3]等; 化学方法: 亚硝基胍^[4]、甲基磺酸乙酯^[5]等, 但这些方法都存在随机性大的缺点, 由于无法知道突变的位点, 故难以进行后续的基因操作。而转座子标签法^[6,7]正好可以避免这些缺点, 转座子标签法是将转座子插入到欲克隆基因的内部或附近, 使得目的基因发生突变, 然后利用转座子所携带的标记作为筛选标志进行突变子的筛选。在此基础上就可以进行目的基因的克隆, 常用的方法有: 建立突变子基因组

* 国家自然科学基金 (No. 30400013)

国家高技术研究发展计划项目 (No. 2003AA241150)

江苏省科技攻关项目 (No. BE2002345, BE2003343)

** 通讯作者 Tel: 025-84396314, E-mail: lsp@njau.edu.cn

收稿日期: 2004-06-14, 修回日期: 2004-08-09

文库, 根据插入突变子上的标记或者是利用已知片段序列, 用杂交法或者抗性标志法筛选含有插入片段的克隆, 通过测序获知插入片段的侧翼序列, 从而获得目的基因的克隆, 也可以利用 Tail-PCR^[8,9]的方法, 根据已知序列设计引物, 直接扩增出突变子中插入片段侧翼序列。在本实验中笔者采用自杀性质粒 pSC123 中的转座子插入到呋喃丹高效降解菌 CFDS-1 中获得插入突变子, 以便为下一步的呋喃丹降解酶系基因的克隆奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

Sphingomonas sp. CFDS-1 (Amp^r, Str^r), 该菌株能完全降解呋喃丹, 从受呋喃丹长期污染的污泥中分离获得。

E. coli DH5 α (pSC123) (Km^r, Cm^r), 为本实验室保存。

1.2 培养基

无碳培养基 (MM): NH₄NO₃ 1.0 g, KH₂PO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 1.5 g, NaCl 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, pH 7.2, 去离子水定容至 1,000 mL; 含呋喃丹的基础培养基 (FMM): 在灭菌后的无碳培养基中加入 100 mg/L 的呋喃丹; LB 培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母膏 5 g, 氯化钠 10 g, 固体培养基中加入 15 g/L 的琼脂。

1.3 农药

呋喃丹 (纯度大于 98%): 购于江苏太仓鲍利葛有限公司。

1.4 试剂类

限制性酶类均购于大连宝生公司, 其余各化学试剂均为分析纯。

1.5 转座子的导入

在含有 100 mg/L 氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 试管中培养菌株 CFDS-1, 同时再加入 50 mg/L 的卡那霉素 (Kam) 和 20 mg/L 的氯霉素 (Cm) 的 LB 试管中培养 *E. coli* DH5 α (pSC123), 分别取 3 mL 菌液于 10,000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 用 LB 对菌体洗涤 2 次, 每管加入 100 μ L 的 LB 液体重悬菌体, 把两管菌悬液混匀, 在 LB 固体平板上放上灭过菌的细菌滤膜 (孔径 0.45 μ m), 把混合菌液滴在滤膜上, 30℃ 培养过夜, 用 LB 液体把菌体洗下, 取适量涂布于含 100 mg/L Amp 和 50 mg/L Kam 的 LB 平板上, 30℃ 培养^[10]。用牙签将单菌落接种于含 100 mg/L Amp 和 50 mg/L Kam 的 LB 试管中, 取长好的菌悬液 200 μ L 一一对应地加入到 FMM 中, 观察是否有红色物质产生, 挑选没有红色物质产生的试管, 该试管对应的菌株初步判定为插入突变子。

1.6 呋喃丹含量的检测

紫外扫描法: 取 1 mL 经过不同处理的 FMM, 加入 5 mL 的二氯甲烷, 剧烈震荡, 静置分层后, 弃上清, 过无水硫酸钠柱, 在 UV-PC401 型分光光度计于 200 ~ 400 nm 段进行扫描, 根据呋喃丹在 283 nm 处的特征吸收峰的峰值来计算溶液中呋喃丹的含量。

气相色谱法: 将经过不同处理的 FMM 于 10,000 r/min 离心 5 min, 取 2 mL 上清液, 加入等体积的丙酮剧烈震荡, 加入氯化钠, 使混合相中的水相成为饱和的氯化钠溶液, 剧烈震荡, 静置后吸出丙酮层, 过无水硫酸钠柱, 把丙酮层稀释至适当浓度, 用岛津 GC-14B 氮磷检测器 (FTD) 检测, 条件为: O.V-225 分离柱, 在空气流速 7.5 mL/min, 氢气流速为 4 mL/min, 氮气流速为 10 mL/min, 进样口温度为 200℃, 柱温

200℃, 检测器温度为 250℃, 外标法进行测定。

1.7 PCR 法验证突变子基因组中的转座子片段

pSC123 质粒的大小为 7,439 bp, 它包含有一个长度为 3,562 bp 的转座子片段, 序列已知, 根据转座子左右两翼序列设计一对引物:

pL: 5'-TTAAGTGTTCCTGTGTCACCT-3' (126 ~ 145 位);

pR: 5'-TCAACATAGTTCCCTTCAAG-3' (3,472 ~ 3,491 位)。

分别以 6 个插入突变子基因组 DNA 和 pSC123 的质粒 DNA 作为模板, 用 LA-Taq 酶进行 PCR, PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5 min, 进入热循环: 94℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 30 s, 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。PCR 产物的酶切验证: 用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Sma* I 对 PCR 产物进行酶切, 把以突变子总 DNA 为模板的 PCR 产物和以 pSC123 质粒 DNA 作模板的 PCR 产物的酶切产物片段大小和数量作对比, 并和理论值进行比较。

2 结果

2.1 突变子的初筛

由于 CFDS-1 能够完全降解农药呋喃丹, 而且在降解过程中伴随着一种目前未知的红色物质的产生^[11], 因此可以通过红色物质的产生与否初步判断呋喃丹的降解情况。在本实验中, 就是以此为筛选标记, 在 1 万多个插入子中共初筛出 6 个插入突变子, 分别命名为 CFDS-M1 ~ CFDS-M6 (图 1)。

2.2 突变子失去降解呋喃丹功能的验证

为了验证突变子失去了降解呋喃丹的功能, 采用紫外扫描法和气相色谱法测定了突变子 CFDS-M1 ~ CFDS-M6 和 CFDS-1 处理的 FMM 中呋喃丹的含量 (图 2, 3)。从图可以看出 FMM 中的呋喃丹经过突变子处理, 不管用紫外扫描法还是气相色谱法测定, 呋喃丹含量基本没有变化, 而经 CFDS-1 处理, 已检测不到呋喃丹的存在, 这就说明了 CFDS-M1 ~ CFDS-M6 确实已经失去了降解呋喃丹的功能。

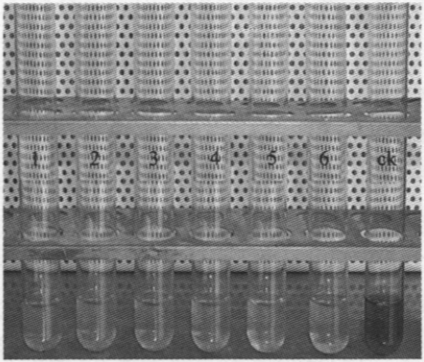


图 1 CFDS-1 插入突变子的颜色变化
1 ~ 6 CFDS-M1 ~ CFDS-M6, CK CFDS-1

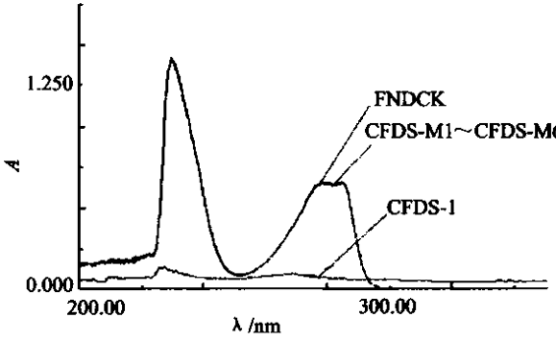


图 2 紫外扫描法测定突变子的性能
FNDCK 不加菌处理的 FMM, CFDS-1 经 CFDS-1 处理的 FMM, CFDS-M1 ~ CFDS-M6 经不同突变子处理的 FMM

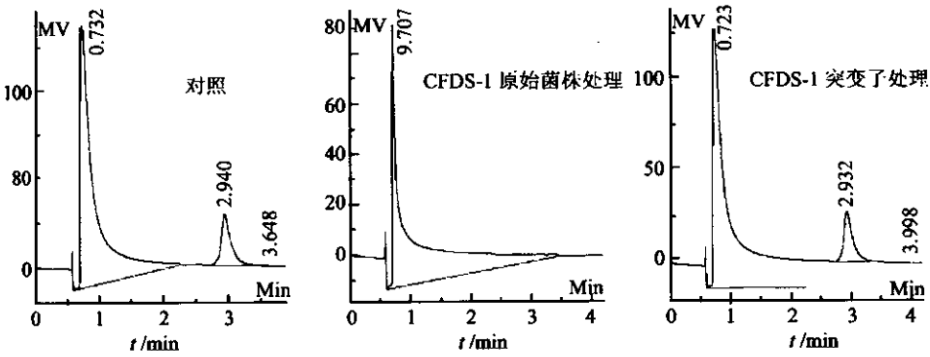


图 3 气谱法测定突变子的性能

2.3 突变子中插入片段的验证

经紫外扫描和气谱检测，可以判定突变子确实已失去了降解呋喃丹的能力，但为了验证突变子确实是由于转座子插入而造成的，首先把突变子接种于含 20 mg/L Cm 的 LB 中培养，结果显示突变子都不能生长，由于 Cm 抗性基因是位于 pSC123 质粒的非转座子序列部位，因此可以判断突变子中不含有整个 pSC123 质粒，而只含有转座子片段。另外根据转座子中的已知片段设计引物进行 PCR 扩增，结果表明，以突变子的基因组 DNA 和 pSC123 的质粒 DNA 为模板，都扩增出了大小相同的片段，并且和理论大小 3,365 bp 相符合（图 4）。在分析转座子序列酶切位点的基础上，对 PCR 产物分别用 *Hind* III 和 *Sma* I 酶切（图 5），从图可以看出，以突变子的基因组 DNA 和 pSC123 的质粒 DNA 为模板的 PCR 产物经 *Hind* III 酶切，都切出了 3 个条带，约为 100 bp、500 bp、2,700 bp，和理论值 101 bp、526 bp、2,738 bp 相一致，而用 *Sma* I 酶切，切出了两条大小约为 2,600 bp、750 bp 的条带，和理论值 2,595 bp、771 bp 相一致。这就表明突变子中确实存在该转座子序列，也就是说突变子 CFDS-M1 ~ CFDS-M6 就是因为插入了转座子而失去了降解呋喃丹的功能。

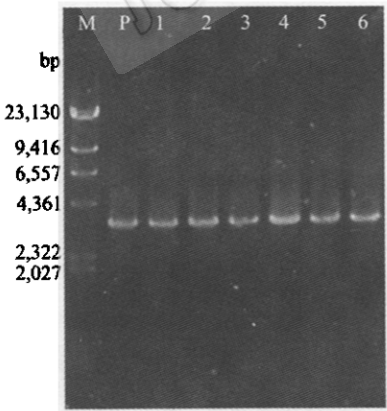


图 4 PCR 扩增产物电泳图谱

M λ DNA / *Hind* III marker, P pSC123, 1 ~ 6 CFDS-M1 ~ CFDS-M6

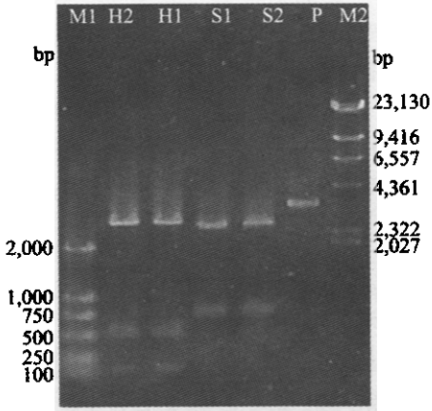


图 5 PCR 产物酶切图谱

M1 DL2000 marker, M2 λ DNA / *Hind* III marker, P PCR 产物, S1 *Sma* I 酶切 pSC123 PCR 产物, H1 *Hind* III 酶切 pSC123 PCR 产物, S2 *Sma* I 酶切突变子 PCR 产物, H2 *Hind* III 酶切突变子 PCR 产物

3 结论

本实验采用转座子标签法通过把 pSC123 质粒中的转座子插入到呋喃丹高效降解菌 CFDS-1 中,从而获得了 6 株失去降解呋喃丹功能的插入突变子。以这 6 株突变子的基因组 DNA 为模板都能扩增出和理论值一致的大小为 3,365 bp 的 PCR 产物,用 *Hind* III 和 *Sma* I 酶切 PCR 产物,酶切片段的数量和大小都和理论值相同。

由此可见,转座子标签法是一种切实可行的方法,这些突变子的获得为下一步的基因克隆奠定了基础。

参考文献

- [1] 王关林,姜 丹,方宏筠,等. 微生物学报, 2004, **44** (1): 23~28.
- [2] 何丽霞,董万胜,冯 达,等. 高原气象, 1998, **17** (1): 95~100.
- [3] 翁伯琦,江枝和,黄挺俊,等. 中国农业科学, 2003, **36** (9): 1065~1070.
- [4] 李 玲,刘相同. 清华大学学报, 1994, **34** (3): 83~87.
- [5] 崔晓勇,曹一平,张福锁. 中国农业大学学报, 1999, **4** (5): 31~36.
- [6] 杨 琳,王金发. 生物技术, 2000, **10** (1): 22~27.
- [7] Owen D J. Mol Gen Genet, 1986, **203** (1): 64~72.
- [8] Yutaka S, Toyotaka M, Hideyuki F L, *et al.* Journal of Experimental Botany, 2001, **52** (354): 145~151.
- [9] Nakayama T, Soma M, Rahmutula D, *et al.* Med Sci Monit, 2001, **7** (3): 345~349.
- [10] 马雪梅,高 东,皱 文. 微生物学通报, 1994, **21** (4): 244~247.
- [11] XiuHong F, Litse O, Andrew O. App Environ Microbiol, 1997, **63** (4): 1332~1337.