

铜绿假单胞菌 PIC-N 萘降解基因的研究

王岳五 张 蓓 净原法藏

(南开大学生物系, 天津 300071)

摘要 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) PIC-N 对萘、邻苯二甲酸、水杨酸等有较强的氧化能力。发现该菌株以萘为底物可诱导产生芳香烃分解酶系。菌株中存在一个 57.4kb 的质粒, 经限制性内切酶 Hind III 处理可产生 7 个片段, 用限制性内切酶 EcoR I 处理可产生 8 个片段。将以限制性内切酶 Hind III 部分酶切的片段克隆至大肠杆菌质粒 pMFY43 上, 获得 29 个克隆株。通过对含有菌株 PIC-N 质粒 Hind III 片段的 7 个重组质粒进行限制酶分析, 绘出了该质粒 Hind III 内切酶 7 个切点的酶切图谱。

关键词 铜绿假单胞菌, 萘降解基因, 分子克隆, 限制酶图谱

多环芳香烃萘、菲、蒽等有致癌性和诱变源性, 可以在生物体内蓄积、浓缩, 成为环境污染源, 对生物圈产生严重影响。自 1973 年以来, 在假单胞菌属若干菌株中发现萘的降解是由质粒基因所决定的^[1-3]。对恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 的萘降解质粒 NAH7 进行了深入研究^[4], 并使 NAH7 萘降解基因在大肠杆菌和恶臭假单胞菌中进行表达^[5-6]。我们采用我国自己分离的铜绿假单胞菌菌株 (*P. aeruginosa*) PIC-N, 对其萘降解质粒基因进行了分析。

1 材料与方法

1.1 菌种

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) PIC-N (含萘质粒), 恶臭假单胞菌 (*P. putida*) G1064 (含萘质粒 NAH7), 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) HB101 (pMFY43) 和大肠杆菌 (*E. coli*) JM109 均为本实验室保存菌株。

· 冈山理科大学工学部 (Faculty of Engineering, Okayama University of Science)

1992-11-16 收稿

1.2 主要试剂

限制性内切酶 Hind III、EcoR I, T4DNA 连接酶, λDNA, 卡那霉素和四环素, 均为华美生物工程公司产品。

1.3 培养基

1.3.1 LB培养基(%)：多聚蛋白胨2, 酵母膏1, NaCl 1, pH7.0 (固体培养基中加琼脂2%)。

1.3.2 BPY培养基(%)：牛肉膏1, 蛋白胨1, 酵母膏0.1, NaCl0.5, pH7.2。

1.3.3 MM培养基(%)：NH₄H₂PO₄0.5, Na₂HPO₄0.15, KH₂PO₄0.15, NaCl 0.05, MgSO₄·7H₂O 0.02, pH7.0。

1.4 对底物的利用

将菌株 PIC-N 接种于 MM 培养基平板上, 倒置, 并在培养基上或在培养皿盖上分别加入 0.3% (W/V) 的萘、邻苯二甲酸、水杨酸、琥珀酸等底物, 于 30℃ 培养 24 小时, 观察菌体生长情况。

1.5 PIC-N 细胞对不同底物代谢过程中的氧化作用

将菌株 PIC-N 接种于添加 0.3% (W/V) 萘的 MM 培养基中, 30℃ 振荡培养至对数生长期后期, 用棉花滤除培养液中未被利用的萘后, 于 4℃ 4000r/min 离心 10min, 收集菌体细胞。用含 NaCl 0.8% 的 10mmol/L 磷酸缓冲液 (SP 缓冲液, pH7.1) 洗 3 次。将洗净的菌体悬于不含氮源的 MM 培养基中, 30℃ 振荡培养 1 小时, 离心收集菌体细胞, 再用 SP 缓冲液洗 1 次, 获得饥饿细胞。取相当于 2.5mg 干菌体的湿菌体及 1200nmol 底物, 定容于 3ml 10mmol/L 磷酸缓冲液中, 于 30℃ 反应 5min, 用 YSI53 型生物用氧检测仪测定氧吸收量 (单位 nmol/min/mg 干菌体)。为了抑制测定时底物对酶的诱导作用, 于体系中加入氯霉素, 终

浓度为 300μg/ml。

1.6 质粒 DNA 的分离与纯化

采用 Hansen 和 Olsen^[7]改良法进行。用于限制性内切酶分析的重组质粒采用蔡宝立等^[8]方法进行分离。

1.7 质粒 DNA 的限制性内切酶酶解

采用 Davis 等^[9]方法。

1.8 限制片段大小的测定

以 λDNA Hind III 限制片段的大小 (kb) 作标准^[10]。根据各未知片段在琼脂糖凝胶电泳中的迁移率与其片段大小 (kb) 的对数成反比的关系绘出标准曲线, 测定未知片段的大小^[11]。

1.9 质粒 DNA 限制片段的克隆

杂种质粒的构建和转化参照 Davis 等^[9]方法。用 Hind III 分别酶解 PIC-N 质粒 DNA 和 pMFY 43DNA, 经 T4DNA 连接酶连接, 转化于大肠杆菌 JM109。转化液涂布于卡那霉素 (Km, 50μg/ml) 平板上, 37℃ 培养过夜。将长出的转化子分别点接于卡那霉素和四环素 (Tc, 15μg/ml) 平板上, 通过 Tc 基因的插入失活选择含有 PIC-N 质粒 Hind III 片段的重组子。

2 结果与讨论

2.1 菌株 PIC-N 对底物的利用 (表 1)

表 1 菌株 PIC-N 在不同底物中的生长

底物	菲	萘	邻苯二甲酸	水杨酸	琥珀酸
生长	-	+++	+++	++	++

"-" 不生长; "++" 生长良好; "+++ 生长极好

由表 1 可以看出, 菌株 PIC-N 能利用萘、邻苯二甲酸、水杨酸生长, 但不能利用菲生长。

2.2 PIC-N 细胞对不同底物的氧化能力 (表 2)

表 2 PIC-N 细胞对不同底物的氧化能力

底物	菲	萘	1-氢-2-萘甲酸	2-氢-3-萘甲酸	邻苯二甲酸	水杨酸	儿茶酚
呼吸量 (nmol/min/mg)	0	151.0	3.2	0	112.6	35.0	244.1

由表2可以看出, PIC-N 细胞对萘的氧化能力是很强的, 呼吸量达 151.0nmol/min/mg 干菌体, 但对菲等基本上无氧化能力。

2.3 质粒 DNA 的分离与确认

采用 Hansen 和 Olsen 改良法分离铜绿假单胞菌 PIC-N 和恶臭假单胞菌 G1064 的质粒 DNA, 进行琼脂糖凝胶电泳分析 (图1)。

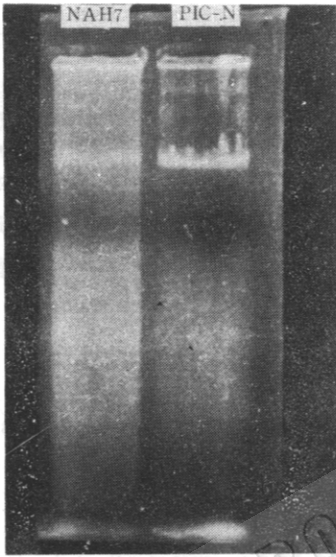


图1 PIC-N 和 G1064 菌株质粒 DNA 琼脂糖凝胶电泳

由图1可以看出, PIC-N 菌株质粒 DNA 的迁移率较 G1064 菌株 NAH7 质粒的迁移率大, 说明 PIC-N 菌株中存在的质粒要比 G1064 菌株的 NAH7 质粒小。

2.4 菌株 PIC-N 质粒 DNA 的限制酶酶解

将 PIC-N 菌株的质粒 DNA 分别用 Hind III、EcoR I 和 EcoR I +Hind III 进行完全酶解, 与 λDNA 标准样一起进行琼脂糖凝胶电泳 (图2)。

由图2可以看出, PIC-N 质粒 DNA 经限制性内切酶 Hind III 酶解可产生 7 个片段 (H1-7), 用限制性内切酶 EcoR I 酶解可产生 8 个片段 (E1-8), 用限制性内切酶 EcoR I +Hind III 酶解可产生 15 个片段, 各片段的长度见表3。

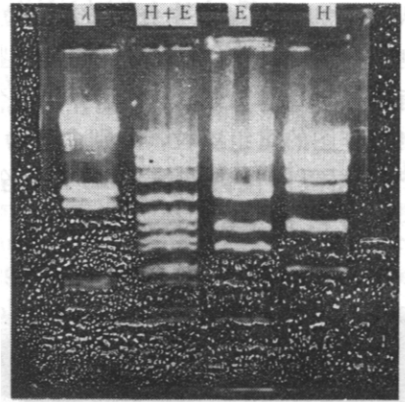


图2 PIC-N 菌株质粒 DNA 的电泳分析

λ: λDNA 标准样;
E: PIC-N 菌株质粒 DNA EcoR I 酶解物;
H: PIC-N 菌株质粒 DNA Hind III 酶解物;
H+E: PIC-N 菌株质粒 DNA Hind III +EcoR I 酶解物

表3 PIC-N 质粒 Hind III, EcoR I 酶切片段大小

片段号	片段大小 (kb)	
	Hind III	EcoR I
1	17.1	16.9
2	14.2	15.7
3	8.7	6.5
4	6.6	6.3
5	5.4	5.1
6	3.3	2.8
7	2.1	1.9
8		1.3

由表3可知, PIC-N 菌株质粒大小约为 57.4kb, 分子量约为 3.7×10^6 d。

2.5 菌株 PIC-N 质粒 Hind III 片段的克隆

将经限制性内切酶 Hind III 完全酶解的 PIC-N 质粒 DNA 片段与 Hind III 切开的载体 pMFY43DNA^[12] 连接成重组质粒, 转化大肠杆菌 JM109, 得到 534 株转化子。经卡那霉素和四环素平板鉴别, 选出 38 株只在卡那霉素平板上生长而在四环素平板上不生长的克隆株。将经限制性内切酶 Hind III 部分酶解的 PIC-N 质粒 DNA 片段连接到载体 pMFY43 中, 经同样选择, 从 476 个转化子中选出 29 株重组子。

2.6 PIC-N 质粒 DNA Hind III 酶切图谱

从上述 29 个克隆株中分离重组质粒, 分别用限制性内切酶 Hind III 进行完全酶解, 鉴定其各含有哪些 Hind III 片段。从中选择出 7 个可用于限制酶作图的重组质粒, 分别命名为 pNP1-pNP7。用限制性内切酶 Hind III 完全酶解 pNP1-pNP7, 确定其所含 Hind III 片段(图 3、表 4)。

表 4 重组质粒 pNP1-7 所含 Hind III 片段

质粒	含 Hind III 片段
pNP1	H3, H7
pNP2	H1, H2
pNP3	H1, H5, H6
pNP4	H1, H5
pNP5	H7, H4
pNP6	H6, H3
pNP7	H2, H4

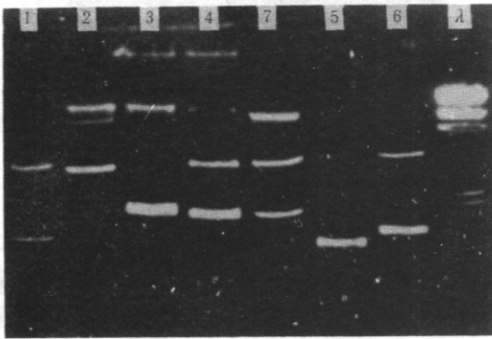


图 3 重组质粒 pNP1-7 电泳结果

1. pNP1; 2. pNP2; 3. pNP3 4. pNP4;
5. pNP5; 6. pNP6 7. pNP7; λ. λDNA 标准样

通过上述一系列实验, 对铜绿假单胞菌 PIC-N 的萘降解质粒基因进行了分析, 为阐明菌株 PIC-N 中萘降解质粒基因的结构和表达控制机制, 进而构建高效降解萘等多环芳香烃并产生水杨酸或其它化工产品的工程菌株, 提供了理论和实验依据。

参 考 文 献

- [1] Dunn NW, Gunsalus IC. *J Bacteriol*, 1973, **114** (3): 974-979.
- [2] Connors MA, Barnsley EA. *J Bacteriol*, 1982, **149** (3): 1096-1101.
- [3] 高才昌, 蔡宝立, 张秀明, 等. *遗传学报*, 1984, **11** (4): 260-264.
- [4] Yen KM. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, **79** (3): 874-878.
- [5] Schell MA. *J Bacteriol*, 1983, **153** (2): 822-829.
- [6] Grund AD, Gunsalus IC. *J Bacteriol*, 1983, **156** (1): 89-94.
- [7] Hansen JB, OLSEN RH. *J Bacteriol*, 1978, **135** (1): 227-238.
- [8] Davis RW, Botstein D, Roth R. *Advanced Bacterial Genetics a Manual for Genetics Engineering*, Cold Spring Harbor New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1980. 227-230.
- [9] 蔡宝立. *环境科学学报*, 1984, **4** (3): 291-294.
- [10] Hinchliffe ED, Kuempel PL, Master M. *Plasmid*, 1983, **9** (3): 286-297.
- [11] Southern E. *Methods Enzymol*, 1979, **68** (1): 152-176.
- [12] 王岳五, 张 蓓, 陈 宁等. *实用重组 DNA 技术*, 天津: 天津科学技术出版社, 1993. 195-202.

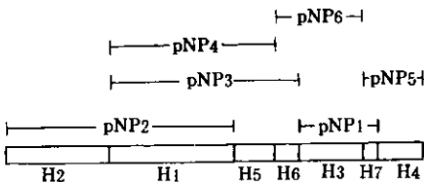
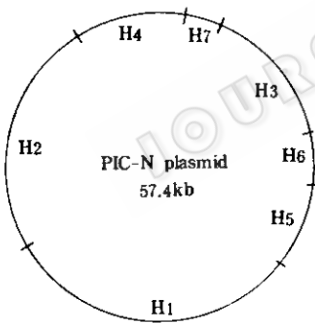


图 4 PIC-N 菌株质粒 Hind III 酶切图谱

根据表 4 数据, 通过分析重组质粒中 Hind III 片段的重叠关系, 可以确定 Hind III 限制片段在 PIC-N 菌株质粒中的排列顺序, 结果见图 4。

STUDY ON SUBCLONE OF NAPHTHALENE DEGRADING GENE OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PIC-N

Wang Yuewu Zhang Bei Kiyohara Hoza
(Department of Biology, Nankai University, Tianjin)

Abstract *Pseudomonas aeruginosa* PIC-N has high Oxidability on naphthalene catechol and salicylic acid etc. Its aromatic hydrocarbon degradase system was induced by using naphthalene as substrate, and a 57.4kb plasmid was found in it. 7 and 8 fragments were produced from the plasmid digested by Hind III and EcoR I respectively. 29 cloned strains have been obtained after cloning restricted fragments of Hind III into E. coli plasmid pMFY43. A cleavage map of 7 enzymic nicks of Hind III was drawn up by using restrictive enzyme to analyse recombinant plasmids.

Key Words *Pseudomonas aeruginosa*, naphthalene degrading gene, molecular clone, cleavage map