

用于废水处理系统中目标酵母动态解析的绿色荧光蛋白基因质粒构建

韩云¹, 邢新会^{2*}, 杨敏^{1*}, 刘敏胜², 娄恺²

(1. 中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室, 北京 100085; 2. 清华大学化学工程系, 北京 100084)

摘要:绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)可用于研究复合微生物体系中特定目标功能菌的特性及动态变化,本研究为确立用于解析酵母细胞在混合酵母废水处理系统中的动态特性的 GFP 技术体系奠定了基础.将 gfp 基因克隆到酵母载体 pACT-URA3 中,再用构建的重组质粒转化宿主菌大肠杆菌(*Escherichia coli* JM109),扩增得到含 gfp 的重组质粒,荧光显微镜照片显示 gfp 基因在大肠杆菌内得到了表达,但表达程度不高;电泳图谱及聚合酶链反应结果表明,含 gfp 基因的质粒不是以游离的形式存在,而可能是以某种特殊的形式和细胞染色体发生了相互作用.

关键词:绿色荧光蛋白;酵母菌处理系统;污泥膨胀;聚合酶链反应

中图分类号:X17 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2004)01-0040-05

Construction of Plasmid with Green Fluorescent Protein Gene for Analysis of Yeasts in Yeast Wastewater Treatment

HAN Yun¹, XING Xin-hui², YANG Min¹, LIU Min-sheng², LOU Kai²

(1. State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, CAS, Beijing 100085, China; 2. Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract:Green fluorescent protein(GFP) can be utilized in analysis of the characteristics and distribution of a targeted strain in microbial communities. This study is the first step to establish a dynamic yeast monitoring technique in a wastewater treatment system using yeast by constructing a fluorescent yeast containing gfp gene. The gfp gene was inserted into pACT1-URA3, a powerful plasmid for introducing a foreign gene into *Candida boidinii*, and then transformed into *E. coli* JM109. The gfp gene was expressed, though not very highly. The results of the electrophoresis and polymerase chain reaction suggested that the newly constructed plasmid containing gfp gene might not exist in free form in the cells, but in some special way such as interaction with the chromosome.

Key words:green fluorescent protein; yeast wastewater treatment; sludge bulking; polymerase chain reaction

在利用酵母复合菌处理有机废水的过程中,本课题组分离筛选出了 5 株高效油降解酵母^[1],并取得了在较高有机负荷下除油率大于 95%,COD 去除率大于 90%的良好处理效果^[2].但该酵母混合处理体系在长期运行过程中出现了较严重的污泥膨胀现象,难以达到良好的固液分离效果.为此,对酵母菌处理体系中的污泥膨胀问题进行了一系列的探讨^[2,3].为了进一步确定引起污泥膨胀的决定性因素,构筑高效稳定的酵母菌污水处理系统,首先需要建立能快速解析混合微生物体系中目标酵母菌动态变化的方法.

一种方便可行的方法就是借助于检测便利的荧光物质来标记酵母细胞.常用的方法有荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridisation, FISH),该技术微生物生态解析上已经得到比较广泛的应用,问题是检测繁琐,耗时较长.利用荧光素酶基因可快速解析复合微生物体系内的特定微生物的动态特性.细菌荧光素酶基因已被成功地用于定量解析

甲苯污染修复体系中的甲苯分解菌的功能,但由于发光反应和细胞浓度及胞内能源代谢活性有关,因而在定量解析复合体系内特定微生物时需要解决胞内代谢活性对发光量的影响^[4,5].与以上 2 种方法相比,绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)技术是一种更好的快速解析复合微生物体系内特定微生物动态变化的方法.GFP 是一种受光激发后能够发射强烈绿色荧光的蛋白质,自 Prasher^[6]首次从水母中克隆得到其 cDNA 以来,GFP 基因已分别在细菌、酵母菌、动植物等生物中得到了表达.由于 GFP 本身对活细胞无毒害作用且不需要添加任何底物即可产生稳定的绿色荧光,现已构建出多种颜色和强度的变异体并被广泛应用于微生物生理学和生物技术研究,如作为报告基因用于工程菌

收稿日期:2003-04-18;修订日期:2003-06-26

基金项目:国家自然科学基金资助项目(50078053,20176025)

作者简介:韩云(1979~),女,硕士生,主要研究方向为水处理技术.

* 联系人

筛选^[7];基因表达调控研究^[8];复杂环境(动植物体内、生物膜、发酵罐或土壤等)中菌体的分布及数量情况研究^[9,10].Nico Boon 等人^[5]将 gfp 基因插入到 睾丸假单胞菌(*Comamonas testosteroni*) 染色体上,利用菌体发射出的荧光解析该菌在降解氯苯胺废水的复合体系中的变化.日本学者也已构建出含 gfp 基因的博伊定假丝酵母(*Candida boidinii*) 工程菌^[3].但目前,GFP 用于复合微生物体系定量解析的研究在中国未见报道.

作为前期研究,本文报道了以 *Candida boidinii* 及 *Escherichia coli* 的穿梭质粒构建 gfp 基因表达载体及其在大肠杆菌中的扩增情况,表明该方法的阶段性成果并提出了实验中遇到的问题.

1 材料与方法

1.1 材料

(1)菌株和质粒 实验中所用的菌株和质粒的性质和来源如表 1 所示.

表 1 实验中所用菌株和质粒
Table 1 Strain and plas mid in the experiment

菌株和质粒	基因型和表型	来源
菌株 JMI 09	recA1 supE44 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac proAB) F' [traD36 proAB ⁺ lacI ^q lacZ ΔMI 5]	清华大学化工系实验室保藏
质粒 pQB-2 ^[11])	Amp ^r , URA3	Dr Kenji Kohno 赠送
质粒 pACT1-URA3 ^[3])	Amp ^r	Dr Yasuyoshi Sakai 赠送

1⁾所选择的用于构建新质粒的原始质粒 2⁾ gfp 基因的来源质粒

(2)培养基 采用 LB 培养基,100 mL 去离子水中加入 1g 细菌培养用胰蛋白胨,0.5g 细菌培养用酵母提取物和 1g 氯化钠.在抗性选择时加入氨苄青霉素 50μg/ mL.

(3)主要的酶试剂 dNTP 和分子克隆工具酶包括各种限制性内切酶,DNA 聚合酶 I Klenow 片断,T4DNA 连接酶均购自宝生物工程有限公司.

(4) PCR 反应体系 购自赛百盛基因技术有限公司.

1.2 方法

(1)质粒 DNA 的提取 采用赛百盛质粒纯化试剂盒

(2)质粒 DNA 的构建 酶切、补平、连接、转化、琼脂糖凝胶电泳分析及感受态细胞的培养均按文献[12]进行.主要步骤如图 1 所示:Sal I 和 BamH I 分别酶切 pACT1-URA3 和 pQB-2 质粒 2h 后,用 DNA 聚合酶 I Klenow 片断对线状质粒的 5' 端补平 15 min,再用 Pst I 分别酶切两质粒 2h,用 T4 连接酶连接,4℃过夜.

(3)转化方法 采用常规的氯化钙法进行基因转化^[12].

(4)质粒 DNA 的回收 采用博大泰克 DNA 片断玻璃奶回收试剂盒

(5)转化子的筛选 将转化的大肠杆菌细胞涂布在含 50μg/ mL 氨苄青霉素的 LB 培养基上,在 37℃培养 12~16h,挑取长出的菌落于液体 LB 培养基中培养,取样于荧光显微镜(Nikon E600) 下观察

其是否发荧光.

(6) PCR 引物设计 为了用 PCR 方法检验转化子,根据 GFP 基因编码区设计上下游引物分别为:

引物 1[5'-GCCCCGGATCCATGAGTAAAG-3'],
引物 2[5'-CACGGATCCTTATTTGTATAGT TCA-3']

(7)PCR 反应条件 PCR 反应以菌体染色体作为模板,分别向 Pre Mix 体系中加入 1μL 引物 1 和引物 2,48μL 无菌水,反应条件如下:94℃热变性 45s,54℃退火 1 min,72℃延伸 1.5 min,30 个循环.反应后的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析.

2 结果与讨论

2.1 可转化酵母的含 gfp 基因的质粒构建

将 pACT1-URA3 和 pQB-2 酶切并经玻璃奶回收后,进行琼脂糖电泳分析.pACT1-URA3 为 4.3kb,Sal I 酶切位点只有一个,因此酶切后,其大小不应发生变化,构型应由原来的环状变为线状,实验结果与此相符(图 2).pQB-2 为 4.1kb,含有 2 个 BamH I 酶切位点,700bp 的 gfp 基因位于较短的 BamH I -BamH I 片断上.实际的酶切产物有约 3400bp 和 700bp 2 个片断,与预期相吻合,其中约 700bp 的 DNA 片断应该是 gfp 基因.利用 Total Lab 1.0 软件分析 DNA 浓度结果如下:pACT1-URA3 浓度为 30ng/μL,gfp 浓度为 5ng/μL,按 gfp:pACT1-URA3 摩尔比 3:1 进行连接实验.连接产物

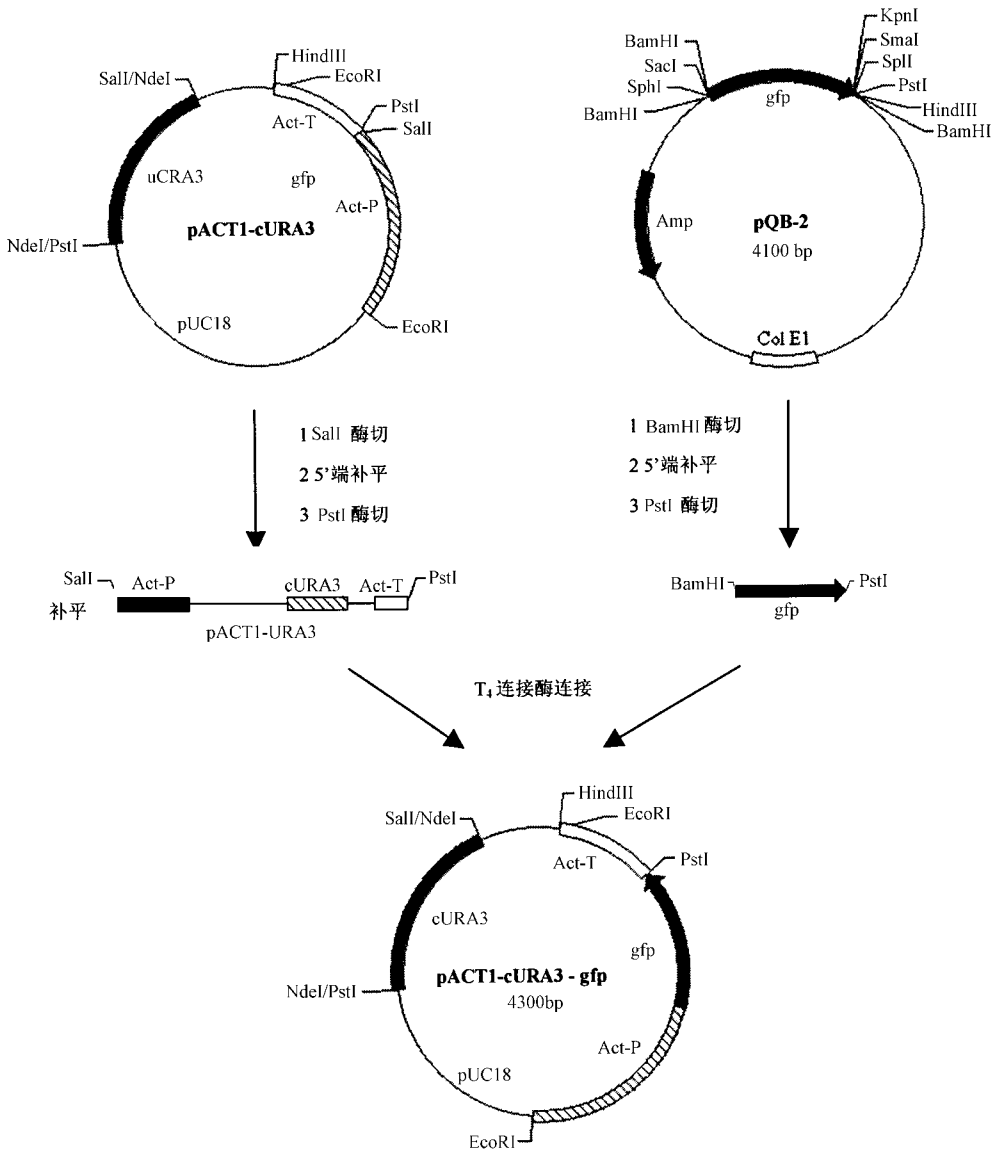
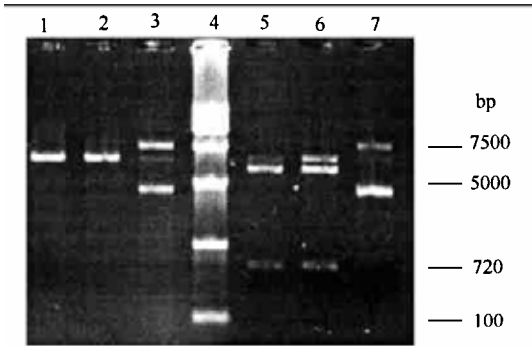


图 1 用于转化酵母的含荧光基因质粒构建

Fig.1 Construction of yeast plasmid



1,2. 酶切后 pACT- URA3 3. 酶切前 pACT- URA3
5,6. 酶切后 pQB-2 7. 酶切前 pQB-2 4. 分子量标记

图 2 酶切后的质粒和目的基因

Fig.2 Plasmid and gfp gene digested

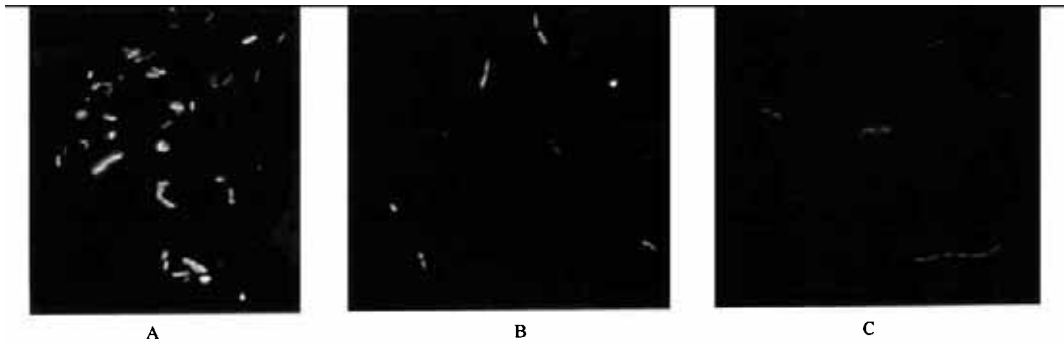
用于转化 *E. coli* JM109.

2.2 重组大肠杆菌的显微镜观察及其生长特性

从含氨苄的 LB 平板上随机挑选 10 个转化子, 分别接种于含有氨苄的 LB 液体培养基中, 于 37℃、150r/min 条件下培养. 10 株菌生长均非常缓慢. 取培养 15h 的培养菌液分别于荧光显微镜下观察, 发现其中 1 株菌(命名为 *E. coli* gfp1 A.) 在 480nm 蓝光激发下发出绿色荧光, 如图 3B、C 所示, 但是 *E. coli* gfp1 A 的形态和颜色均与含 pQB 2(含 GFP 基因)的大肠杆菌(以下称对照, 如图 3A 示)有明显差别. *E. coli* gfp1 A 发出的荧光没有对照强, 并且 *E. coli* gfp1 A 多是 2~4 个菌连在一起, 显示菌体难以

正常分裂.与 *E. coli* gfp1 A 同批培养的其余 9 株菌均没有发荧光,但能在氨苄抗性平板上长出菌落,这可能是由以下原因引起的:质粒并没有导入大肠杆菌细胞内,菌体能在抗性平板上生长是因为转化细胞培养时间较长或转化细胞铺平板时密度较高造成

氨苄青霉素抗性的转化体将 β 内酰胺酶分泌到培养基中,迅速灭活菌落周围区域中的抗生素,引起对氨苄青霉素敏感的卫星菌落生长^[12],即假阳性菌生长,而将假阳性菌再次接入液体培养基中时,菌体几乎不生长.



A. 对照,含 pQB-2 的大肠杆菌 B,C. 构建质粒转化后的大肠杆菌

图 3 蓝色光激发下发绿色荧光的大肠杆菌

Fig.3 *E. coli* emitting green fluorescence when activated with blue light

对 *E. coli* gfp1 A 进行生长特性研究,结果表明,培养 15h 后菌体在 660nm 波长下的光密度值只从 0.01 增加到 0.073,菌体生长非常缓慢,与含 pQB-2 的大肠杆菌 JM109 的生长情况差别很大(图 4). *E. coli* gfp1 A 生长缓慢的原因将在 2.3 中进行讨论.

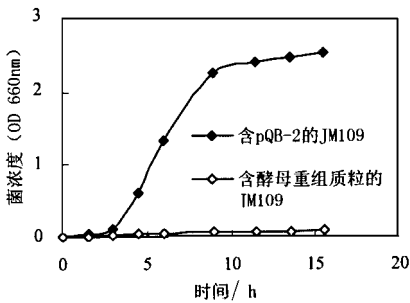


图 4 工程菌生长曲线

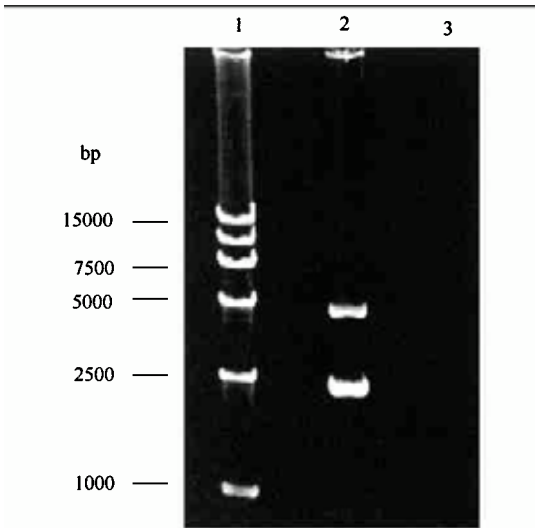
Fig.4 Growth curve of recombined strain

2.3 重组质粒的提取及进一步检验

从获得的重组大肠杆菌 *E. coli* gfp1 A 中小量提取质粒,然后进行琼脂糖电泳分析,结果如图 5 所示.从图中可以看出,对照有 2 个条带,分别是原 pACT1-URA3 质粒的单体和二聚体,而样品的电泳结果没有条带出现,表明没有提取到构建的质粒.为了找出菌体发绿色荧光原因,直接用平板上菌体做模板进行了 PCR 实验,进一步检验菌体中是否含有 gfp 基因.

PCR 反应得到的产物进行琼脂糖电泳,结果如

图 6 所示,在 700bp 处得到 PCR 产物,这与 gfp 大小相吻合;而以双蒸水为模板的空白对照没有得到 PCR 产物.说明 gfp 确实存在于大肠杆菌细胞内.上述结果表明,在转化后的大肠杆菌中,质粒不是游离存在的,而是以某种特殊的方式存在.一种可能是,构建的质粒与染色体发生了相互作用,影响了菌体的染色体分裂,从而影响菌体正常分裂,导致菌体生长缓慢.这一现象比较奇特,目前还未见类似的报道,需进一步深入研究.

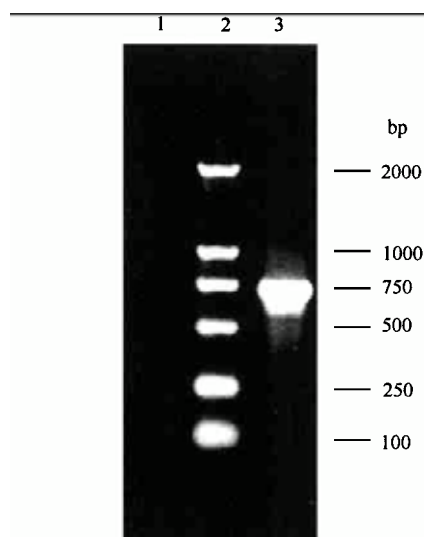


1. 分子量标记 2. 对照(pACT1-URA3 原质粒)
3. 从转化后的大肠杆菌中提取的质粒

图 5 提取质粒的电泳结果

Fig.5 The electrophoresis of plasmid extracted

为解决上述问题,下一步需要进行的工作包括:



1. 空白对照(以双蒸水为模板)
2. 分子量标记 3. 转化后的大肠杆菌

图 6 *gfp* 基因的 PCR 鉴定

Fig.6 PCR assay of *gfp* gene

①选不同的大肠杆菌(比如 *E. coli* BL21)为受体菌,将新构建质粒转化到其中,探讨质粒扩增的可行性;或②将含有 *gfp* 基因的重组质粒直接转化至目标菌 *Candida boidinii* 中,解析其在酵母废水处理体系中的动态变化。

3 小结

将含有 *gfp* 基因的酶切连接产物转化至受体菌 *E. coli* JM109 后,新的重组菌能够在 480nm 蓝光激发下发出绿色荧光,但表达程度不是很高,质粒的导入在一定程度上影响了菌体的正常生长.本研究为确立用于解析酵母细胞在混合酵母废水处理系统中的动态特性的 GFP 技术体系奠定了前期基础。

致谢:感谢日本 Dr Kenji Kohno 和 Dr Yasuyoshi Sakai 赠送质粒。

参考文献:

[1] 郑少奎,杨敏,杨清香,等. 自然选育酵母菌对不同废水处理

及资源化研究[J]. 上海环境科学,2001,20(11):525~529.

- [2] Zheng S K, Yang M, Lv W Z, *et al.* Study on sludge expansion during treatment of salad oil manufacturing wastewater by yeast[J]. Environmental Technology, 2001, 22(5): 533~542.
- [3] 吕文洲,杨敏,郑少奎,等. 酵母菌处理系统中丝状菌性膨胀的诱因及控制研究[J]. 环境科学学报,2001,21(3): 59~64.
- [4] Xing X H, Tanaka T, Matsumoto K, *et al.* Characteristics of a newly created bioluminescent *Pseudomonas putida* harboring TOL plasmid for use in analysis of a bioaugmentation system[J]. Biotechnology Letters, 2000, 22(8): 671~676.
- [5] Tanaka T, Xing X H, Matsumoto K, *et al.* Preparation and characteristics of resting cells of bioluminescent *Pseudomonas putida* BLU[J]. Biochemical Engineering Journal, 2002, 12(1): 23~30.
- [6] Lorang J M, Tuori R P, Martinez J P, *et al.* Green fluorescent protein is lighting up fungal biology[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(5): 1987~1994.
- [7] Cormack B, Valdivia R H, Falkow S, *et al.* FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP) [J]. Gene, 1996, 173(1): 33~38.
- [8] Sakai Y, Yurimoto H, Matsuo H, *et al.* Regulation of peroxisomal proteins and organelle proliferation by multiple carbon sources in the methylotrophic yeast [J]. Yeast, 1998, 14(6): 1175~1187.
- [9] Sternberg C, Christensen B B, Johansen T, *et al.* Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(9): 4108~4117.
- [10] Boon N, Goris J, Vos P D, *et al.* Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-Degrading *Comamonas testosteroni* strain, I2gfp [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(7): 2906~2913.
- [11] Kimata Y, Iwaki M, Lim C R, *et al.* A Novel Mutation which enhances the fluorescent protein at high temperatures [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, 232(1): 69~73.
- [12] J·萨姆布鲁克,等著,金冬雁,等译. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 北京:科学出版社,1992.50~55.