

# 选育蒽降解微生物耦合系统菌株的电融合及融合子的筛选

张甲耀<sup>1</sup>, 季淼<sup>2</sup>, 方呈祥<sup>1</sup>, 陈菲莉<sup>1</sup>, 陈玲<sup>1</sup>, 邓欢欢<sup>1</sup>

(1. 武汉大学资源环境学院环境科学系, 武汉 430072; 2. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 合肥 230009)

**摘要:**对选育蒽降解微生物耦合降解系统菌株的电融合过程及融合子的筛选进行研究. 结果发现在 500kHz 的交流频率, 脉冲强度 300 V/cm, 脉冲幅宽为 5 $\mu$ s, 脉冲个数为 2, 交流电场强度在 20 ~ 40 V/cm 范围内, 总融合率较稳定. 可以用红霉素和氨苄青霉素的双抗平板来对表面活性剂产生菌与土生优势菌的融合子进行筛选, 用含卡那霉素的蒽的高渗平板对蒽的高效降解菌和土生优势菌的融合子进行筛选. 2 种融合子均可以用绿色荧光来确认.

**关键词:**融合子; 耦合系统; 电融合技术; 抗性; 高效降解菌; 微生物

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2004)01-0049-04

## Electrofusion of Building Coupling System for Degrading Anthracene and Fusants' Choices

ZHANG Jia-yao, JI Miao, FANG Cheng-xiang, CHEN Fei-li, CHEN Ling, DENG Huan-huan

(1. School of Environmental Science and Resource, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2. School of Food & Biology, Hefei Industry University, Hefei 230009, China)

**Abstract:** Some researches have been carried out for the electro fusion of building coupling system for degrading anthracene and the choices of fusants. During the experiments, total rate of fusion stable in alternation current frequency 500kHz, impulse intensity 300 V/cm, impulse width 5 $\mu$ s, amount of impulse 2 and alternation current intensity 20 ~ 40 V/cm were found. The resistant plate with erythromycin and ampicillin can screen the fusant of autochthonous bacterium and surfactant-producing bacterium. The resistant plate with anthracene and karnamicin can screen the fusant of autochthonous bacterium and efficient anthracene-degradation bacterium. The new fusants were found to have stable fluorescent characteristics.

**Key words:** fusant; coupling system; electro fusion; resistant; efficient degradation bacterium; microbe

生物修复技术一直是处理污染土壤的重要方法,而在生物修复中降解有机污染物的微生物起着至关重要的作用.土壤是一种极其复杂的系统,对土壤中污染物的降解清除需要多种微生物的参与,构建有利于降解的耦合系统则有助于对降解过程的强化和提高降解速率.本文以蒽为目标污染物,用蒽的高效降解菌、表面活性剂产生菌与土生优势菌通过细胞融合技术得到 2 种融合子,传代后得到 2 种菌株,它们具有降解蒽,产表面活性剂又能在土壤中旺盛生长的能力.将融合株接种到黄麻根际构成耦合降解系统,以期取得良好降解效果.

在细胞融合技术方面传统上可分为 2 种,化学诱导融合和物理诱导融合.前者经常用 PEG, DMSO, Ca<sup>2+</sup> 等作为诱导融合剂,后者则采用各种物理因子如 pH, 温度, 渗透条件, 离心等促进融合<sup>[1]</sup>.电融合技术是利用外电场诱导原生质体融合.它是介于化学和物理方法之间或者两者兼而有之的融合技术<sup>[2]</sup>.

本文主要研究了利用电融合技术,以三环芳烃蒽为模式污染物,分别将由污染土壤中筛选的蒽的高效降解菌和已经标记的产生表面活性剂的铜绿假单胞菌<sup>[3]</sup>(*Pseudomonas aeruginosa*)与从实验土壤中分离出的土生优势菌融合得到 2 种新的融合子并对融合子作筛选与检测,为今后将它们定殖到植物根际构建蒽的降解微生物耦合系统奠定基础.

### 1 材料和方法

#### 1.1 主要材料

(1) 土样来源 武汉染料厂的含有蒽等多环芳烃有机物污染物染料污泥.

(2) 菌种 黄麻根际土生优势菌 Tur-1 A: 由黄麻根际筛选,经抗性标记并带有绿色荧光蛋白标记;蒽的高效降解菌 Arr-2: 由实验用的含蒽等多环芳烃的

收稿日期: 2003-01-08; 修订日期: 2003-03-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 20077021)

作者简介: 张甲耀(1946 ~), 男, 教授, 主要研究方向为环境生物工程.

武汉染料厂染料污泥中筛选出抗性标记;铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*):表面活性剂产生菌 P<sub>7-50</sub>(经诱变和抗性标记得来),由中国典型培养物保藏中心提供)。

(3)培养基 P<sub>7-50</sub>完全培养基:葡萄糖 1g,牛肉膏 0.5g,酵母膏 0.5g,蛋白胨 1g,NaCl 0.5g,pH 7.2,水 100 mL;再生培养基:在完全培养基中添加 0.5 mol/L 的蔗糖,0.02 mol/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O;AN2 完全培养基:蛋白胨 1g,酵母膏 0.5g,NaCl 1g,水 100 mL,加入溶于 7.5 mL N,N-二甲基甲酰胺的葱 0.1g;再生培养基:在完全培养基中添加 0.5 mol/L 的蔗糖,0.02 mol/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O。

(4)溶菌酶 购自武汉华美生物有限公司,酶活大于 2000 μ/mg,用渗透压稳定剂配制,过滤除菌,终浓度分别为 1 mg/mL 和 2 mg/mL。

(5)试剂 渗透压稳定剂(SMM):蔗糖 0.5 mol/L,MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.02 mol/L,pH 7.5。电极缓冲液(PM):甘露醇 0.6 mol/L,CaCl<sub>2</sub> 0.02 mol/L,pH 6.0。

(6)仪器 电融合仪:CRY-3 型多功能细胞电融合仪,购于宁波新芝科器研究所。倒置显微镜。

## 1.2 方法

(1)原生质体的制备 将亲株 P<sub>7-50</sub>自新鲜斜面接一环到 5 mL 完全液体培养基的试管,置 37 °C 培养过夜,按 1:10 的比例转入盛有 5 mL 完全液体培养基的试管中,培养 6 h 后,使细胞生长进入对数期。上述培养物经离心收集菌体(4 000 r/min,4 °C,15 min),用稳定剂洗涤 2 次,弃上清液,加入 6 mL 溶菌酶溶液,终浓度为 1 mg/mL,置 37 °C 水浴保温 0.5 h,2 000 r/min 离心 10 min 收集原生质体。

亲株 AN2,Tur1 A 分别取培养至对数生长期前期的细胞,在溶菌酶终浓度为 2 mg/mL,酶解时间在 0.5 h 时制备的原生质体,具体方法同上。

(2)原生质体电融合 将荧光蛋白标记的 Tur1 A 和 P<sub>7-50</sub>原生质体悬液(10<sup>8</sup> 个/mL)等量混合,用电击缓冲液洗涤 3 次。最后离心沉淀用缓冲液悬浮。用无菌吸管将 2 亲本原生质体混合液取 1 mL 注入电融合小池<sup>[4]</sup>,将小池置于倒置显微镜的载物台上,接通正弦信号电源,经电解质电泳使原生质体形成稳定的串珠状。融合脉冲电压分别以 350 V、450 V 550 V,脉冲幅宽 5 μs,脉冲个数 2,脉冲间隔 50s,进行电融合。室温放置 15 min,取出原生质体融合液,用 SMM 液作适当稀释,取原液 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>各 0.2 mL 涂布再生含红霉素和氯霉素平板,30 °C 倒置

培养 48 h。

将具有高效降葱能力的 AN2 制备的原生质体用上述的同样方法与 Tur1 原生质体混合,经电融合后取融合液,稀释涂布于含葱 100 mg/L 和卡那霉素的高渗选择性平板上,28 °C 倒置培养 48 h。

用 CRY-3 型电融合仪进行原生质体融合。该仪器的融合电压、频率、脉冲幅宽、个数及间隔时间均可调节。电极为相距 0.5 mm 的 2 条银丝做融合试验。

在倒置显微镜下观察融合过程。原生质体融合率 = 融合原生质体数/原生质体总数 × 100%。

(3)融合子检出及测定 对带有绿色荧光蛋白标记的 Tur1 A 菌株和 AN2 进行各种抗生素的检测确定较好融合子抗性标记。选择再生平板上生长较快且表现绿色荧光的菌落,同时把挑选出的抗性菌落传 5 代,检测融合子遗传性状是否稳定。同时进行细胞形态观察和体积大小的测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 高频交流电场对原生质体电融合的影响

电融合过程分 2 步进行,原生质体首先在高频交流电场中排列成串,然后在高压直流脉冲作用下,部分彼此接触的原生质体发生融合,融合基本是同步的,完成整个融合过程约需 3~15 min。

(1)交流频率(kHz) 在交流电场强度 20 V/cm,脉冲强度 300 V/cm,脉冲幅宽 5 μs,脉冲个数为 2 的情况下交流频率的影响见表 1。

表 1 交流频率对原生质体融合的影响

交流频率 / kHz	Tur1 A 与 P <sub>7-50</sub> 融合率/ %	Tur1 A 与 AN2 融合率/ %
10	0	0
500	9.3	11.6
750	8.7	11.2
1000	9.3	10.8

从表 1 可知,交流电场的频率从 500 kHz 增加到 1000 kHz,交流频率对原生质体融合率影响不大。但当交流频率低于 10 kHz 时,观察到部分原生质体有旋转现象,说明交流频率太低会引起原生质体共振旋转<sup>[5]</sup>。这种旋转妨碍了原生质膜之间的紧密相接,导致原生质体的融合不能进行,而 500 kHz 的交流频率就能完全阻止这种旋转。为此实验采用的交流频率为 500 kHz。

(2)交流电场强度(V/cm) 交流电场强度决定

原生质体间膜接触程度.若电场强度太小,即使形成原生质体串珠,经脉冲刺激后仍难于融合.而过高的电场强度,促使原生质体过分拉长,导致质膜发生不可逆化,甚至破裂.试验结果表明,在脉冲强度 300 V/cm,脉冲幅宽 5  $\mu$ s,脉冲个数为 2 时,交流电场强度在 20 ~ 40 V/cm,总融合率较为稳定(表 2).

表 2 交流电场强度对原生质体电融合的影响

Table 2 The effect of AC strength on protoplast electro fusion

电场强度 / V·cm <sup>-1</sup>	Tur1 A 与 P <sub>7-50</sub> 融合率 / %	Tur1 A 与 AN-2 融合率 / %
10	0	0
20	5.3	8.6
30	6.7	11.4
40	5.4	11.8

## 2.2 直流脉冲对原生质体电融合的影响

(1) 脉冲强度 如图 1 所示,当脉冲幅宽固定为 5  $\mu$ s,脉冲个数固定为 2,起始脉冲强度 50 V/m 时,融合率随脉冲强度增加而上升,当脉冲强度为 450 V/m 时, Tur1 A 与 AN-2 原生质体融合率为 18.8%,随着脉冲强度进一步增加,融合率反而开始下降.而 Tur1 A 与 P<sub>7-50</sub> 原生质体融合液在脉冲强度达到 350 V/m 时,融合率为 11.3%,此后随脉冲强度的增加,融合率变化不大.

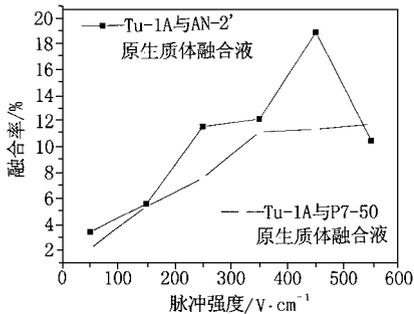


图 1 脉冲强度对原生质体电融合的影响

Fig.1 The effect of pulse strength on protoplast electro fusion

(2) 脉冲个数 当脉冲幅宽固定为 5  $\mu$ s,从图 2 中可以看出,2 种原生质体融合液脉冲个数超过 2 个时,随着脉冲个数的增加,2 种原生质体融合液的融合率稍有增加后开始下降.

## 2.3 原生质体电融合的观察

融合操作在倒置显微镜观察下进行.当原生质体在融合小室中充分沉淀后,逐渐增大高频交变电场强度至 450 V/m (500kHz).原生质体在电场增强过程中向电极方向移动,并彼此紧密接触,沿电场方向形成“串珠”结构,使原生质体发生瞬间膜击穿融

合.观察结果表明绝大多数都是两两融合,有少数是 3 个以上融合成一个.个别较脆弱的原生质体在电击后破裂消失.

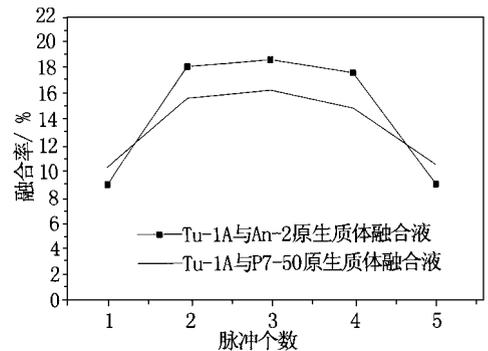


图 2 脉冲个数对原生质体电融合的影响

Fig.2 The effect of number of pulse on protoplast electro fusion

## 2.4 融合子的筛选与性状测定

(1) 融合子选择平板的确定 Tur1 A 和 AN-2 在多种抗生素 (100 mg/L) 的高渗培养基上不生长,而 AN-2 为卡那霉素敏感型,但在高渗平板上生长良好,所以用含卡那霉素的萹高渗平板来筛选融合子(表 3),同时用绿色荧光来确证.

而 P<sub>7-50</sub> 为红霉素抗性,氨苄青霉素敏感型, Tur1 A 对红霉素敏感,对氨苄青霉素抗性.所以用红霉素和氨苄青霉素的双抗平板来对融合子进行筛选,同时用表达绿色荧光来进一步进行确证.结果见表 3.

表 3 融合子选择平板的确定

Table 3 Determine the plate of isolation the fusants

菌株	卡那霉素抗性 (100 $\mu$ g / mL)	萹高渗平板 (100 mg / L)	红霉素 (100 $\mu$ g / mL)	氨苄青霉素 (100 $\mu$ g / mL)
Tur1 A	+	-	-	+
AN-2	-	+	-	-
P <sub>7-50</sub>	-	-	+	-

(2) 融合子的筛选与性状测定 Tur1 A 与 P<sub>7-50</sub> 原生质体融合后在含有红霉素和氨苄青霉素双抗的选择性平板得到一种融合子,菌落生长速度较慢,菌落形态与 P<sub>7-50</sub> 相似,在自然光下呈黄色,在紫外灯下可见微弱的绿色荧光.但把这种融合子在含氨苄青霉素的平板上进行点种,发现生长出的菌落在自然光下表现较强的绿色,与亲株 Tur1 A 颜色相似,如图 3 所示.

而 Tur1 A 与 AN-2 原生质体融合后在含萹 100 mg/L 的高渗培养基上得到 2 种形态的菌落,一种菌落较小(直径约为 0.1 mm),菌落为半透明的球

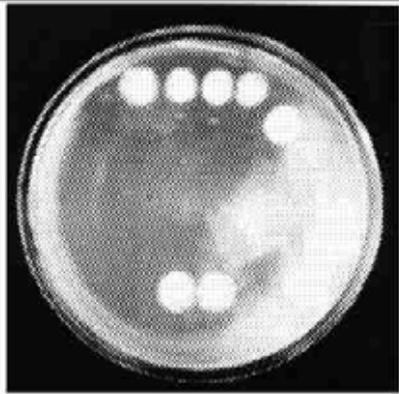


图3 在自然光下 Tur1A 与 P<sub>7-50</sub> 融合子

Fig.3 Fusants under the general light of Tur1A and P<sub>7-50</sub>

形,菌落形态与 AN-2 相似,在紫外灯下观察没有绿色荧光.另一种菌落的颜色为乳白色,菌落较大,生长较快,菌落形态与 Tur1 相似,紫外光下表现出微弱绿色荧光.经重新点种于含葱的完全培养基平板,前者菌落颜色未呈绿色,而后者表现强烈绿色荧光.因为 Tur1A 在含葱 100 mg/L 的高渗培养基的对照上不生长,所以可以肯定,这种表现绿色荧光且在含葱平板上生长的菌株为 2 株亲株的融合子.

把这 2 种融合子进行多次传代培养,挑选出几株生长稳定,接入斜面保存.

### 3 小结

(1) 实验结果发现在 500kHz 的交流频率,脉冲强度 300 V/cm,脉冲幅宽为 5 $\mu$ s,脉冲个数为 2,交流电场强度在 20 ~ 40 V/cm 范围内,总融合率较稳定.

(2) 对绿色荧光蛋白标记好的 Tur1A 进行了各

种抗生素检测,发现其对红霉素敏感,同时由于增强荧光蛋白质粒的转入使其带有氨苄青霉素抗性.而 P<sub>7-50</sub> 为红霉素抗性,氨苄青霉素敏感型,所以选择红霉素和氨苄青霉素的双抗平板来对融合子进行筛选,同时用表达绿色荧光来进一步进行确证.

(3) 由于 Tur1A 为卡那霉素抗性并在含葱 100 mg/L 的高渗培养基上不生长,而 AN-2 为卡那霉素敏感型,但在葱高渗平板上生长良好,所以用含卡那霉素的葱高渗平板来筛选融合子,同时用绿色荧光来确证.

(4) 本实验所得的 2 株融合子分别是强化型葱降解菌和强化型表面活性剂降解菌,它们与原先的葱降解菌和表面活性剂降解菌相比具有更强的存活能力与适应能力.对它们在自然土壤环境中的存活与降解特性将进一步研究与检验.

### 参考文献:

- [ 1 ] 王天池,林蔡.电融合技术在植物细胞工程中的应用现状[J].植物学通报,1994,11:19~24.
- [ 2 ] Jacob J, Karcher W. Polycyclic aromatic hydrocarbons of environmental and occupational importance[J]. Fresenius Z Anal. Chem., 1986, 233:1~10.
- [ 3 ] Meyer S, Steinhart H. Fate of PAHs and Hetero-PAHs during Biodegradation in a Model Soil / Compost-System: Formation of Extractable Metabolites[J]. Water, Air, Soil Pollut., 2001, 132:215~231.
- [ 4 ] Jones M G K, Lindsey K. Plant biotechnology in agriculture [J]. The Biotechnology Series, 1988, 2:241~245.
- [ 5 ] Morikawa H, Iida A, et al. Gene transfer into intact plant cells by electroinjection through cell walls and membranes. Gene, 1986, 41:121~124.