

洋葱伯克霍尔德菌 T1828 质粒消除 方法及条件

钟义军^{1,2,3} 吴晓玉^{1,3*} 刘好桔^{1,3} 武琳² 饶志强^{1,3} 王园秀^{1,3}

(1. 江西农业大学生物科学与工程学院 江西 南昌 330045)

(2. 江西省红壤研究所 江西 南昌 331717)

(3. 南昌市发酵应用技术重点实验室 江西 南昌 330045)

摘要: 采用十二烷基硫酸钠和提高生长温度结合法、紫外线涂布平板法、冻融法、吖啶橙法和黄芩甙提取液消除法等方法消除洋葱伯克霍尔德菌 T1828 菌株质粒, 探讨适合洋葱伯克霍尔德菌质粒消除的方法, 并研究最佳质粒消除条件。结果表明十二烷基硫酸钠和提高生长温度结合法最适合于洋葱伯克霍尔德菌 T1828 质粒消除, 同时最佳消除条件为: 在 T1828 培养 16 h 后加入 SDS 使其终浓度 0.1%, 36 °C 处理 18 h, 消除率达到 49%。筛选到的无质粒突变株可以用于进一步的研究。

关键词: 洋葱伯克霍尔德菌 T1828, 质粒消除, 质粒提取, 消除条件

Plasmid elimination method and conditions of *Burkholderia cepacia* T1828

ZHONG Yi-Jun^{1,2,3} WU Xiao-Yu^{1,3*} LIU Hao-Ju^{1,3} WU-Lin² RAO Zhi-Qiang^{1,3}
WANG Yuan-Xiu^{1,3}

(1. College of Bioscience and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045, China)

(2. Red Soil Institute of Jiangxi Province, Nanchang, Jiangxi 331717, China)

(3. Nanchang Key Laboratory of Fermentation Application and Technology, Nanchang, Jiangxi 330045, China)

Abstract: To explore the suitable for *Burkholderia cepacia* plasmid elimination method and study the optimal conditions for plasmid elimination, we eliminated plasmid of *Burkholderia cepacia* T1828 by using sodium dodecyl sulfate and improving the growth temperature combination method, UV-coated plate method, freeze-thaw method, acridine orange method and baicalin extraction methods such as elimination methods. The results showed that sodium dodecyl sulfate and improving the growth temperature combination method is best suited to *Burkholderia cepacia* T1828 plasmid elimination, while the best conditions

for the elimination are T1828 culture after 16 h by adding SDS to 0.1% of the final solubility dealt with 18 h at 36 °C, the elimination rate reach 49%. The plasmid-free mutant strains can be used for further study.

Keywords: *Burkholderia cepacia* T1828, Plasmid elimination, Plasmid extraction, Eliminate conditions

冠菌素(也称冠毒素, Coronatine, 简称 COR)是微生物产生的高活性次生代谢产物。研究发现, COR 类似茉莉酸甲酯(Methyl jasmonate, 简称 MeJA)诱导水稻颖花快速开放^[1-2], 且 COR 的作用效果高于后者^[3], COR 还可引起植物茎块的肥厚症, 诱导植物过度生长、抑制根的伸长及刺激乙烯的生成^[4-6], 在农业上具有广阔的应用前景。

江西农业大学发酵应用技术重点实验室分离筛选得到一株产冠菌素的菌株 BCC933, 并以此为出发菌株, 经选育筛选出高产冠菌素菌株 Y5.7 和 T1828, 经鉴定为洋葱伯克霍尔德菌 *Burkholderia cepacia*, 该菌属产冠菌素的性能为国内外首次报道^[7-8]。国内外报道的产冠菌素的菌株大部分属于假单胞菌属, 包括丁香假单胞大豆褐斑病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea*、丁香假单胞李溃疡病菌 *P. syringae* pv. *morsprunorum*、丁香假单胞麦叶褐斑病菌 *P. syringae* pv. *atropurpurea* 和丁香假单胞番茄叶斑病菌 *P. syringae* pv. *tomato*, 除丁香假单胞斑点病菌 *P. syringae* pv. *maculicola* 外, 其他假单胞菌冠菌素合成基因均位于质粒上, 其基因大小约为 90 kb^[9]。

质粒是染色体外具有独立复制能力的、对细菌生存非必需的小型共价闭合环状双链 DNA 分子, 在细菌细胞内普遍存在^[10]。细菌的某些表型特征, 包括抗性、代谢能力、致病性、共生现象、结合转移等往往由质粒控制。某些质粒可自然丢失, 频率仅为 10^{-2} – 10^{-8} , 用某些物理、化学方法处理, 可使子代细菌中的质粒消除, 其消除频率比自然丢失增加 10^2 – 10^5 倍。质粒消除后其控制的表型特性不再恢复, 除非外源质粒转入^[11]。目前质粒的消除方法很多, 由于结构及生理上的独特性, 不同菌株的质粒消除机制各不相同, 到目前为止, 尚没有普遍适用的质粒消除方法^[12]。

本文拟采用十二烷基硫酸钠和逐步提高生长温度结合法、紫外线涂布平板、冻融法、吡啶橙法和

黄芩甙消除法等方法处理菌株 T1828, 获得菌株 T1828 质粒消除的适宜方法与条件, 为探讨菌株产冠菌素性能与质粒之间关系提供材料。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌株: 洋葱伯克霍尔德菌 T1828 由南昌市发酵应用技术重点实验室分离获得。

1.1.2 培养基: (1) LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 5, 3 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

(2) 固体 LB 培养基: 液体培养基中加 20% 的琼脂。

(3) 无质粒菌株筛选培养基: 固体 LB 培养基中加入终浓度为 100 mg/L 的氨苄青霉素。

1.2 试验方法

1.2.1 十二烷基硫酸钠(SDS)和逐步提高生长温度结合法^[13]: (1) 将 T1828 接种于 30 mL LB 肉汤培养液, 30 °C、180 r/min 振荡培养 16–18 h; (2) 取 300 μ L 接种于 0.1% SDS 的 LB 肉汤培养基中, 30 °C 振荡培养 20 h; (3) 取 300 μ L 接种于 30 mL 不含 SDS 的 LB 肉汤内, 39 °C 振荡培养 20 h; (4) 重复(2)、(3)步 2 次; (5) 取 300 μ L 接种于 30 mL 不含 SDS 的 LB 肉汤培养基中, 30 °C 振荡培养 16–18 h; (6) 以碱裂解法快速提取质粒 DNA, 电泳检测。

1.2.2 紫外线涂布平板照射法^[10]: (1) 将试验菌株接种于固体 LB 斜面, 30 °C 培养 20 h; (2) 用 5 mL 生理盐水洗下菌苔, 稀释, 取 200 μ L 用 LB 玻棒涂布于营养琼脂平板; (3) 将涂布的平板在 30 W 紫外灯下照射 2 min, 同时取不照射的涂布平板作为对照以便观察试验对试验菌生长的影响, 30 °C 温箱培养 20 h; (4) 挑取单个菌落, 接种至无质粒菌株筛选培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 20 h; (5) 以碱裂解法快速提取质粒 DNA, 电泳检测。

1.2.3 冻融法^[10]: 在浓度为 2×10^9 – 4×10^9 个/mL 的

受试菌株细胞悬液中加入 5% 的甘油, 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 彻底冷冻后, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 完全融化, 再于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 速冻, 然后再融化, 如此重复 30–35 次后取 $200\text{ }\mu\text{L}$ 菌液涂布无质粒菌株筛选平板, 挑取单菌落接种至无质粒菌株筛选培养基过夜培养后, 以碱裂解法快速提取质粒 DNA, 电泳检测。

1.2.4 吡啶橙法(AO)^[14]: 在 LB 培养基中添加 10% 的 AO 母液, 使 AO 终浓度为 200 mg/L , 接种 T1828 种子液, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 180 r/min 培养 48 h。然后取 $200\text{ }\mu\text{L}$ 菌液涂布无质粒菌株筛选平板, 挑取单菌落接种至无质粒菌株筛选培养基过夜培养后, 以碱裂解法快速提取质粒 DNA, 电泳检测。

1.2.5 黄芩甙法^[15]: 将 T1828 接种于液体 LB 培养基中过夜培养, 再经过 4 h 活化后调菌液溶度至 9×10^8 个/mL, 加入黄芩甙使其终溶度为 100 mg/L 。于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光振荡培养 48 h 后, 取 $200\text{ }\mu\text{L}$ 菌液涂布无质粒菌株筛选平板, 挑取单菌落接种至无质粒菌株筛选培养基过夜培养后, 以碱裂解法快速提取质粒 DNA, 电泳检测。

1.2.6 无质粒突变株传代稳定性试验: 将出发菌株 T1828 和 11 株无质粒突变株分别在 LB 肉汤中繁殖 50 代后, 提取质粒, 电泳检测是否有质粒重现现象。

1.2.7 SDS 和提高生长温度结合法消除质粒条件优化: 考察 SDS 浓度、生长温度、SDS 处理时间和 SDS 加入时间对洋葱伯克霍尔德菌 T1828 质粒消除的影响, 并计算消除率。

消除率(%)=无质粒突变株总数/LB 固体平板上菌落总数 $\times 100\%$

2 结果与分析

2.1 SDS 和高温高浓度处理交替培养 T1828 结果
菌株 T1828 经过 SDS 和高温高浓度处理交替培养后, 涂布平板挑出了 24 株菌株, 接种到 LB 肉汤中过夜培养后, 用碱裂解法快速提取细菌质粒, 电泳检测结果(图 1)表明在挑出的 24 株细菌中, 2、3、4、5、6、7、8、15、16、23 和 24 号菌株没有质粒条带, 表明这 11 株菌株质粒得到消除。

2.2 紫外线涂布平板照射法消除 T1828 质粒结果
T1828 菌株在 30 W 紫外线灯处理 2 min 后, 挑出了部分菌株, 接种到 LB 肉汤中过夜培养后, 用碱裂解法快速提取细菌质粒, 电泳检测结果显示紫外线对洋葱伯克霍尔德菌 T1828 菌株质粒消除没有效果, 没有得到无质粒突变株。

2.3 冻融法消除 T1828 质粒质粒结果

T1828 菌株在经过 34 次冻融后, 涂布平板挑出部分单菌落, 接种到 LB 肉汤中过夜培养后, 用碱裂解法快速提取细菌质粒, 电泳检测结果显示冻融法对洋葱伯克霍尔德菌 T1828 菌株质粒消除没有效果, 没有得到无质粒突变菌株。推测其原因可能是洋葱伯克霍尔德菌质粒过大, 大约 90 kb 以上, 一般的物理方法难于消除该菌属质粒。

2.4 吡啶橙法消除 T1828 菌株质粒结果

菌株 T1828 经 200 mg/L 的吡啶橙处理 48 h 后, 取 $200\text{ }\mu\text{L}$ 涂布平板, 培养 24 h 后挑取部分单菌落过夜培养, 用碱裂解法快速提取细菌质粒, 电泳检测结果(图 2)显示, 洋葱伯克霍尔德菌 T1828 经吡啶橙处理后, 在挑出的单菌落中筛选到 1 株无质粒菌株, 即 1 号泳道菌株。

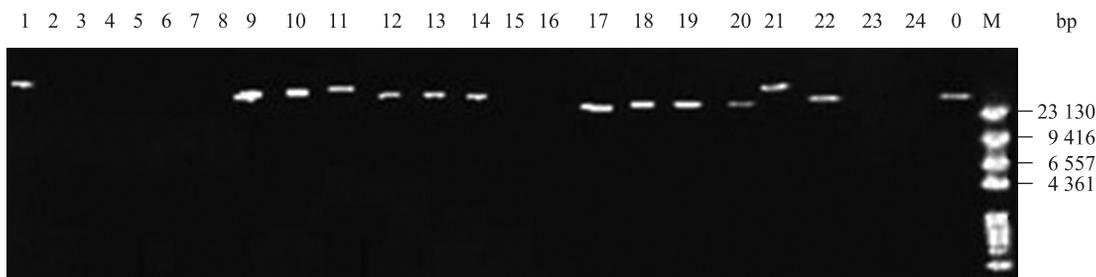


图 1 质粒消除株电泳图

Fig. 1 Plasmid DNA electrophoresis map after plasmid elimination electrophoresis

注: M: λ Hind III; 0: 出发菌株 T1828 质粒; 1–24: 处理后菌株。

Note: M: λ Hind III; 0: Plasmid DNA of T1828; 1–24: Treated strains.

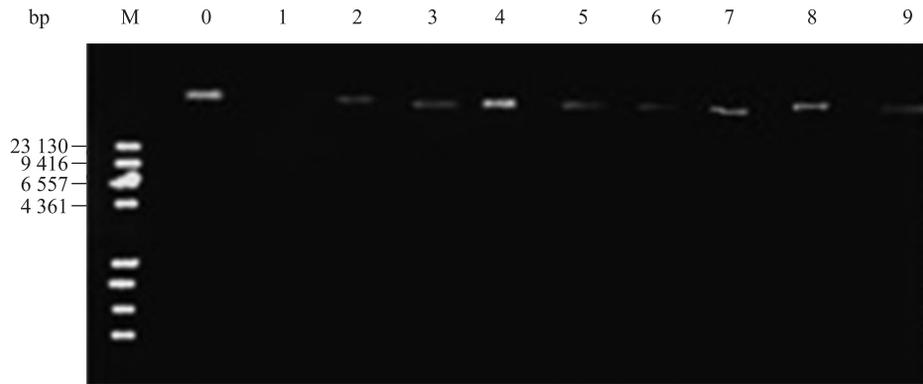


图 2 吡啶橙法处理菌株电泳图

Fig. 2 Plasmid DNA electrophoresis map after plasmid elimination electrophoresis by AO

注: M: λ Hind III; 0: 出发菌株 T1828 质粒; 1-9: 处理后菌株.

Note: M: λ Hind III; 0: Plasmid DNA of T1828; 1-9: Treated strains.

2.5 黄芩甙消除 T1828 菌株质粒结果

用终浓度为 100 mg/L 的黄芩甙避光处理菌株 T1828 48 h 后, 取 200 μ L 涂布平板, 培养 24 h 后挑取部分单菌落过夜培养, 以碱裂解法快速提取细菌质粒, 电泳检测结果显示黄芩甙对洋葱伯克霍尔德菌 T1828 菌株质粒消除没有效果, 没有得到无质粒菌株。

2.6 无质粒突变株稳定性检测结果

将出发菌株 T1828 和 11 株无质粒突变株一起繁殖 50 代后, 提取质粒, 检验是否有质粒重现现象。电泳检测结果见图 3。11 株无质粒突变株仍无质粒条带, 说明这 11 株突变株质粒消除的性能稳定, 可以此为材料进行相关的产冠菌素性能研究。



图 3 第 50 次繁殖无质粒突变株质粒 DNA 电泳图

Fig. 3 No. 50 of plasmid DNA electrophoresis map of plasmid elimination strains

注: M: λ Hind III; 0: 出发菌株 T1828 质粒; 1-11: 无质粒突变株.

Note: M: λ Hind III; 0: Plasmid DNA of T1828; 1-11: Plasmid elimination strains.

2.7 SDS 和提高生长温度结合法消除质粒条件优化

2.7.1 SDS 浓度对质粒消除的影响: SDS 浓度对消除细菌的质粒有很大影响, 低浓度不能完全改变质粒在细胞膜上的结合位点, 不能使某些与质粒复制及分配有关的蛋白部分或完全失活, 质粒消除效果偏低。而高浓度的 SDS 则能抑制细菌的生长, 消除率同样偏低。在 LB 基础培养基中分别加入一定量的 10% SDS, 使最后处理终浓度分别为 0.01%、0.02%、0.05%、0.1%、0.15%; 并在各种培养基中接种 50 μ L 的 T1828 种子液, 使各试管最后总体积达到 5 mL。接种后 30 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 16-18 h 后, 取 50 μ L 培养液加入到不含 SDS 的 LB 培养基中, 35 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 16-18 h。如此重复 3 次。筛选无质粒突变株后计算消除率, 得到如图 4 所示的结果。

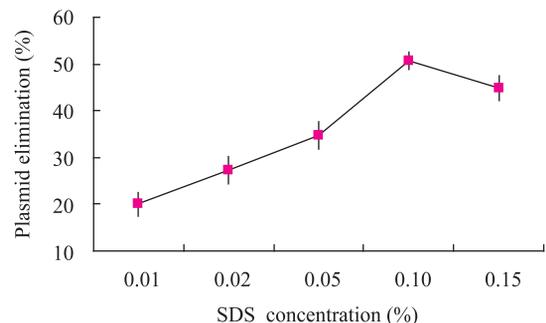


图 4 SDS 浓度对质粒消除的影响

Fig. 4 SDS concentration on the impact of plasmid elimination

从图 4 可以看出, 低浓度的 SDS 对消除 T1828 质粒效果不佳, 培养基中 SDS 终浓度为 0.02% 时质粒消除率为 25.3%, 浓度为 0.1% 时消除率则达到了最高, 为 50.7%, 而 0.15% 时质粒消除率仅为 44.8%。表明冠菌素产生菌 T1828 质粒消除的最佳 SDS 浓度是 0.1%。

2.7.2 生长温度对质粒消除的影响: 温度可以使细菌质粒的复制受到抑制, 或者使部分细菌质粒不够稳定, 从而使质粒丢失。提高温度是一种物理方法, 单独使用时消除效果不佳, 一般需要和化学方法连用。同时, 提高的温度幅度对质粒消除和细菌生长都有很大影响, 因此需要考察提高温度的程度。在 LB 基础培养基中加入 50 μL 的 10% SDS, 使 SDS 处理浓度为 0.1%, 接种 50 μL 的 T1828 种子液, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 16–18 h 后, 取 50 μL 培养液加入到不含 SDS 的 LB 培养基中, 选取 30 $^{\circ}\text{C}$ 、33 $^{\circ}\text{C}$ 、36 $^{\circ}\text{C}$ 、39 $^{\circ}\text{C}$ 和 42 $^{\circ}\text{C}$ 5 个不同温度分别培养 16–18 h。如此重复 3 次。筛选无质粒突变株后计算消除率的结果见图 5。

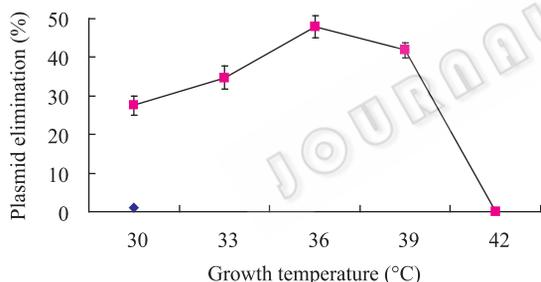


图 5 生长温度对质粒消除的影响

Fig. 5 Growth temperature effects on plasmid elimination

图 5 表明温度对 T1828 质粒消除的影响较大, 最适生长温度 30 $^{\circ}\text{C}$ 和 33 $^{\circ}\text{C}$ 时消除率均低于 35%, 36 $^{\circ}\text{C}$ 时质粒消除率最高, 达到 47.9%, 温度再提高则消除率下降, 到 42 $^{\circ}\text{C}$ 时则完全抑制了出发菌株 T1828 的生长, 消除率为 0。

2.7.3 SDS 处理时间对质粒消除的影响: 在 LB 基础培养基中加入 50 μL 的 10% SDS, 使 SDS 处理浓度为 0.1%, 接种 50 μL 的 T1828 种子液, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 分别培养 14、16、18、20 和 22 h 后, 取 50 μL 培养液加入到不含 SDS 的 LB 培养基中, 36 $^{\circ}\text{C}$

培养菌液 16–18 h。重复 3 次。消除率结果见图 6。

图 6 的结果表明消除率随 SDS 处理时间变化而变化, 处理时间为 14 h 和 22 h 时消除率很低, 分别为 34.7% 和 35.2%, 处理时间为 18 h 时质粒消除效果达到最佳, 消除率为 46.9%, 所以洋葱伯克霍尔德菌质粒消除最佳 SDS 处理时间为 18 h。

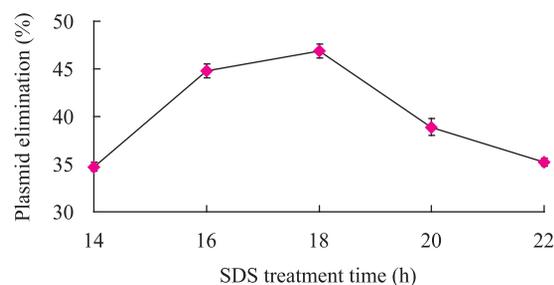


图 6 SDS 处理时间对质粒消除的影响

Fig. 6 SDS treatment time effects on plasmid elimination

2.7.4 SDS 添加时间对质粒消除的影响: 在基础培养基中接种培养 0、8、16、24 和 36 h 时分别加入 SDS, 使 SDS 处理浓度为 0.1%, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 18 h 后, 取 50 μL 培养液加入到不含 SDS 的 LB 培养基中, 36 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16–18 h。重复 3 次。筛选无质粒突变株后计算消除率, 得到如图 7 所示的结果。

图 7 结果表明在细菌生长的延滞期和衰亡期添加 SDS 时质粒消除率比较低, 在对数期和稳定期添加 SDS 时的质粒消除率比较高, 最高为 16 h 左右, 为 47.3%, 即在细菌培养到 16 h、 OD_{600} 值 1.0–1.2 时的质粒消除率较高。

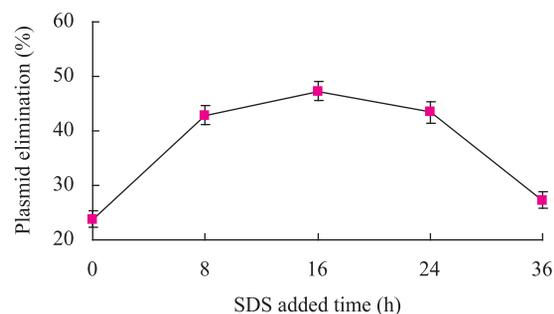


图 7 SDS 添加时间对质粒消除的影响

Fig. 7 SDS added time effects on plasmid elimination

3 小结和讨论

江西农业大学应用微生物研究室分离筛选得到一株产冠毒素(COR)的菌株 BCC933-30, 以此为出发菌株筛选出菌株 Y5.7 和 T1828, 其冠菌素产量依次上升, 且经鉴定均属于洋葱伯克霍尔德菌, 这在国内外尚未见相关报道。目前, 对该菌属合成冠菌素的研究主要集中于发酵水平和生理功能方面, 对分子遗传机制没有过多的关注。本研究主要通过对洋葱伯克霍尔德菌 T1828 质粒消除方法和最佳质粒消除条件的研究, 期望获得无质粒突变株, 通过无质粒突变株可以进一步研究洋葱伯克霍尔德菌的遗传机制。

本研究采用了十二烷基硫酸钠(SDS)和逐步提高生长温度结合法、紫外线涂布平板、冻融法、吡啶橙法和黄芩甙消除法等方法处理洋葱伯克霍尔德菌 T1828, 结果表明 SDS 和逐步提高生长温度结合法以及吡啶橙法对该菌属的质粒消除是有效果的, 且 SDS 和逐步提高生长温度结合法效果更佳, 是最适合于该菌属质粒消除的方法。但在该方法处理过程中各泳道质粒大小有不同程度的差异, 其原因是否和 SDS 处理有关有待于进一步考察。

本研究同时通过单因素实验考察了 SDS 和逐步提高生长温度结合法消除洋葱伯克霍尔德菌 T1828 质粒的最佳条件, 实验结果表明在 T1828 培养 16 h 时加入 SDS 使其终浓度 0.1%, 36 °C 处理 18 h 时消除效果最佳, 可使消除率达到 49%左右。

本试验获得的产冠菌素无质粒突变株, 在下一步试验中可以通过发酵提取冠菌素, 经 HPLC 检测后确定产冠菌素是否和质粒相关, 以及有何种相关, 为菌株产冠菌素性能与质粒之间关系提供材料。同时, 无质粒突变株可以通过 Tn-5 转座子插入诱变试验初步定位洋葱伯克霍尔德菌产冠菌素基因。

参 考 文 献

[1] 曾晓春, 周燮. 茉莉酸甲酯诱导水稻颖花开放[J]. 植物

学报, 1999, 41(5): 560-562.

- [2] 曾晓春, 周燮, 吴晓玉. 水稻的颖花开放机理研究进展[J]. 中国农业科学, 2004, 37(2): 188-195.
- [3] 曾晓春. 茉莉酸类对稻、高粱和果园草颖花开放的诱导效应[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2000.
- [4] Kienow L, Schneider K, Bartsch M, et al. Jasmonates meet fatty acids: functional analysis of a new acyl-coenzyme A synthetase family from *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(2): 403-419.
- [5] Pérez-Martínez I, Zhao YF, Murillo J, et al. Global genomic analysis of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plasmids[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 59(6): 625-635.
- [6] Weingart H, Stubner S, Schenk A, et al. Impact of temperature on in planta expression of genes involved in synthesis of the *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine[J]. MPMI, 2004, 17(10): 1095-1102.
- [7] 王园秀, 吴晓玉, 丰娟, 等. 一株产冠菌素新菌种的分离与鉴定[J]. 微生物学报, 2010, 50(1): 23-28.
- [8] 吴晓玉, 储炬, 王园秀. 冠毒素高产菌株的半推理选育[J]. 江西农业大学学报, 2008, 30(5): 888-893.
- [9] Yong SA, Park SK, Rodgers C, et al. PhySical and functional characterization of the gene cluster encoding the polyketide phytotoxin coronatine in *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*[J]. J Bacteriol, 1992, 174(6): 1837-1843.
- [10] 娄恺, 班睿, 赵学明. 细菌质粒的消除[J]. 微生物学通报, 2002, 29(5): 99-103.
- [11] 李裘清, 周岐新, 凌保东. 耐药质粒消除的研究概况与展望[J]. 川北医学院学报, 2003, 18(2): 168-171.
- [12] 龙海英, 刘衡川, 方梅. 质粒消除方法及消除效果的评价研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(3): 413-415.
- [13] 李林, 杨超, 刘子铎, 等. 苏云金芽孢杆菌无晶体突变株的逐级升温筛选及其转化性能[J]. 微生物学报, 2000, 40(1): 86-90.
- [14] Frederich MA, Roger B, Robert EK, et al. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 39-43, 587-593.
- [15] 刘克, 关键, 李菁华, 等. 黄芩甙对铜绿假单胞菌 R 质粒的消除作用[J]. 微生物学杂志, 2003, 23(2): 49-56.