

# 烟酸羟基化菌株鞣酮丛毛单胞菌 JA1 抗性质粒的消除

杨 瑶, 袁 生, 尚 广东, 戴亦军

(江苏省生物多样性和生物技术重点实验室, 南京师范大学生命科学学院微生物工程重点实验室, 江苏 南京 210097)

[摘要] 鞣酮丛毛单胞菌 JA1 可羟基化烟酸产生 6-羟基烟酸, 并且对多种抗生素具有抗性. 碱变性法提取 JA1 细胞内的质粒, 检测到一个约 19 kb 大小的质粒. 用 0.002 5% SDS 进行质粒消除实验, 结果表明, 质粒消除后菌株对卡那霉素敏感, 但仍对氨苄青霉素、安普霉素和链霉素具有抗性, 推测质粒携带卡那霉素的抗性基因. 同时, 质粒消除后, JA1 菌株烟酸脱氢酶活性没有变化, 推测烟酸脱氢酶的基因并不在质粒上.

[关键词] 质粒消除, 烟酸脱氢酶, *Comamonastestosteroni* JA1, 抗生素抗性

[中图分类号] Q819 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2007)02-0077-04

## Elimination of the Resistance Plasmid in *Nicotinic Acid Hydroxylation Strain Comamonastestosteroni* JA1

Yang Yao, Yuan Sheng, Shang Guangdong, Dai Yijun

(Jiangsu Key Laboratory of Biodiversity and Biotechnology, Key Lab of Microbial Technology in the School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

**Abstract** *Comamonastestosteroni* JA1, catalyzing the hydroxylation from nicotinic acid to 6-hydroxynicotinic acid, was found to resist to many antibiotics. A alkaline lysis extraction of the JA1 culture reveals a 19 kb plasmid. 0.002 5% SDS treatment of the strain eliminated the extrachromosomal plasmid. The mutants lost the kanamycin resistance ability while keeping the nicotinic acid hydroxylation activity.

**Key words** plasmid elimination, nicotinic acid dehydrogenase, *Comamonastestosteroni* JA1, antibiotic resistance

## 0 引言

6-羟基烟酸是一种重要的合成农药、医药、染料等化合物的中间体<sup>[1-3]</sup>, 由于它广阔的开发前景, 利用微生物转化生产 6-羟基烟酸已成为国内外研究热点<sup>[4-8]</sup>. 鞣酮丛毛单胞菌 JA1 是本实验室保藏的一株具有很高烟酸生物转化产生 6-羟基烟酸能力的菌株, 它的发酵催化过程已作报道.

烟酸经羟基化生成 6-羟基烟酸是烟酸微生物代谢反应的第一步, 该反应是由烟酸脱氢酶催化的<sup>[9]</sup>. 对该酶的基因进行克隆, 能够揭示酶的性质和作用机理, 也能够通过构建高活性的转化工程菌, 大幅度提高 6-羟基烟酸的生产效率. 目前, 很多对烟酸脱氢酶的研究都是从酶的分离纯化开始的<sup>[10-12]</sup>, 但由于该酶是个膜结合蛋白, 分离工作难度很大. 本实验室以鞣酮丛毛单胞菌 JA1 为研究对象, 拟采用构建基因组文库的手段筛选目的基因. 在研究中, 发现鞣酮丛毛单胞菌 JA1 具有氨苄青霉素、卡那霉素、安普霉素和链霉素抗生素抗性, 以上抗生素则不能作为筛选标记, 需要通过多步分子生物学手段替换合适的筛选标记, 试验才能进行.

有报道指出很多细菌的抗生素抗性是由内源性质粒引起的<sup>[13-17]</sup>. 因此, 本文利用质粒消除的方法, 考

收稿日期: 2006-10-20 修回日期: 2006-11-12

基金项目: 江苏省高校自然科学重大基础研究(06KJA21016)、江苏省“六大人才高峰”(06-C-014)资助项目.

作者简介: 杨 瑶(1981-), 女, 博士研究生, 主要从事微生物转化的学习与研究. E-mail: cranny\_yang@hotmail.com

通讯联系人: 袁 生(1956-), 教授, 博士生导师, 主要从事微生物转化的教学与研究. E-mail: yuansheng@njnu.edu.cn

察睾酮丛毛单胞菌 JA1 质粒与抗生素抗性的相关性, 目的是获得对抗生素敏感的突变株, 解决需要替换抗性标记的问题.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

本实验室保藏的是睾酮丛毛单胞菌 *C. testosteroni* JA1 菌株<sup>[16]</sup>.

### 1.2 菌株的纯化与活化

冻存管菌种接种于平板 30℃、48 h 后, 转接入种子培养液中 (在 100 mL 锥形瓶中装液 20 mL), 30℃ 摇瓶培养 12 h 以 0.1% 的接种量接入发酵培养基 (在 100 mL 锥形瓶中装液 20 mL), 30℃、200 r/min 培养到对数期.

### 1.3 抗生素抗性检测

选取 5 种不同的抗生素: 氨苄青霉素、卡那霉素、四环素、安普霉素和链霉素, 在 LB 培养基中加入不同浓度的这 5 种抗生素, 铺成平板, 考察菌株在平板上的生长情况, 已确定是否对抗生素存在抗性.

### 1.4 质粒抽提及检测

根据文献<sup>[17]</sup>按碱裂解法进行质粒抽提. 质粒 DNA 在 0.8% 的琼脂糖凝胶 (含 0.5 μg/mL 溴化乙锭) 中电泳, 电泳缓冲液为 1×TAE, 用美国 BD-RAD 凝胶成像系统拍照保存.

### 1.5 质粒的消除

取活化的菌种按 1% 的接种量分别接入含不同浓度 SDS 的 LB 液体培养基中, 30℃ 振荡培养 24 h 后, 取 50 μL 培养液涂平板, 30℃ 倒置培养 24 h 进行菌落计数. 取平板上生长的菌落, 接种于 3 mL 液体培养基中, 30℃ 振荡培养过夜, 按方法 1.4 进行质粒 DNA 的抽提和电泳检测, 计算消除率.

### 1.6 质粒消除后菌株生长特性的检测

#### 1.6.1 菌株对抗生素的抗性检测

按照方法 1.3 对消除后的菌株进行抗性检测. 将质粒消除后的菌株挑单菌落于 3 mL LB 培养基中, 30℃ 摇床培养 12 h 取 50 μL 培养液涂布抗性平板.

#### 1.6.2 烟酸脱氢酶酶活的测定

取质粒消除后的菌株接入含 1% 烟酸的 3 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 30℃ 培养 12 h 定量吸取 0.5 mL 菌液离心 (5 000 r/min, 10 min), 菌体用 0.02 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 7.0) 0.5 mL 洗涤一次, 悬浮于 0.5 mL 此缓冲液中 (含 1% 的烟酸). 反应体系置于 1.5 mL 离心管中, 于 30℃ 振荡 (200 r/min) 反应 120 min 随后, 反应液加热灭活 (100℃, 5 min), 离心 (5 000 r/min, 10 min) 取上清供测试. 在上述反应条件下, 1 min 催化烟酸生成 1 μmol 6-羟基烟酸所需的酶量定义为一个活力单位 (U). 转化产物 6-羟基烟酸的测定参照文献<sup>[18]</sup>进行.

## 2 结果与分析

### 2.1 JA1 菌株对抗生素的抗性

对 JA1 菌株抗生素抗性的实验结果表明, 该菌株对氨苄青霉素、卡那霉素、安普霉素和链霉素均有抗性, 而对四环素没有抗性, 如表 1 所示.

表 1 JA1 菌株对抗生素的抗性  
Table 1 The antibiotics resistance of JA1

抗生素	氨苄青霉素		卡那霉素		四环素		安普霉素		链霉素	
浓度 /(μg/mL)	50	100	50	100	5	10	50	100	50	100
生长情况	++	++	++	++	-	-	++	++	++	++

注: ++ 生长良好; - 不生长.

### 2.2 质粒消除剂浓度的确定

常用的质粒消除剂十二烷基苯硫酸钠 (SDS) 对 JA1 菌株的生长抑制情况见表 1. SDS 在对质粒进行消除的同时, 会对细菌的生长有抑制作用, 按照实验需要, 选择 0.002 5% 的 SDS 对 JA1 菌株进行质粒消除.

表 2 质粒消除剂 SDS对 JA1 菌株的生长抑制

Table 2 The effect of different concentration of plasmid curing reagents on the growth of JA1

SDS 浓度 /%	0	0.000 50	0.001	0.001 50	0.002 0	0.002 5	0.003 0	0.003 5
50 $\mu$ L 菌数 /个	6.49 $\times 10^9$	3.23 $\times 10^5$	1282	534	132	15	1	0

2.3 质粒消除率

采用上述浓度的 SDS 对 JA1 菌株进行质粒消除,在平板上随机选取 12 个菌落培养后进行质粒抽提,结果见图 1. JA1 菌株含一个大小约为 19 kb 的质粒,在所挑选的 12 个菌落中,6 号和 9 号菌落检测不到质粒,可见 SDS 对 JA1 菌株的质粒有消除作用,质粒消除率为 16.7%. (为区别起见,将 6 号和 9 号菌编号为 JA1-6 和 JA1-9).

2.4 质粒消除后菌株特性的变化

2.4.1 菌株对抗生素抗性的改变

JA1-6 和 JA1-9 在 LB 平板上生长正常,在含氨苄青霉素、安普霉素和链霉素的 LB 平板上同样生长良好,未受影响,而在含卡那霉素的 LB 平板上没有生长.这个结果表明,抗生素氨苄青霉素、安普霉素和链霉素的抗性与这个质粒没有关系,可能是由染色体编码的,而抗生素卡那霉素的抗性则与这个质粒有关,可能抗性基因位于质粒上.

2.4.2 菌株对烟酸脱氢酶酶活的改变

对 JA1-6 和 JA1-9 按方法 1.7.2 进行了烟酸脱氢酶活的测定,与质粒未消除的菌株 JA1 羟基化酶活相比较.结果表 3 表明,质粒消除后,菌株的烟酸脱氢酶酶活不改变,可见,烟酸脱氢酶活的基因不在质粒上.

采用 2 样本均数差异显著性 *t* 检验统计分析,  $T = 1.087 4$  和  $1.008 9(p > 0.05)$  差异不显著.

表 3 质粒消除前后烟酸脱氢酶活性比较

Table 3 The change of the nicotinic acid hydroxylation activity after plasmid curing

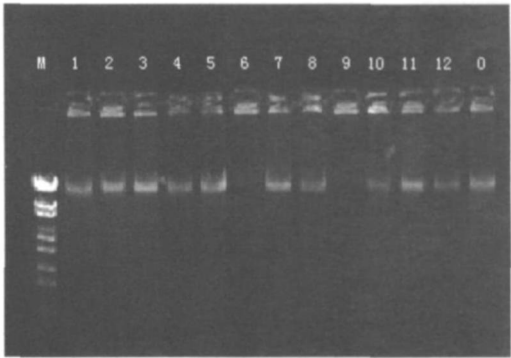
菌株	JA1	JA1-6	JA1-9
烟酸脱氢酶活 /(U /mL)	0.40 $\pm$ 0.04	0.39 $\pm$ 0.02	0.39 $\pm$ 0.02

3 讨论

已报道的质粒消除的方法很多,包括物理法、化学试剂法、抗生素法等<sup>[19]</sup>. 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,目前尚没有普遍适用的质粒消除方法. 本文采用的是十二烷基苯硫酸钠 (SDS) 法, SDS 是一种离子型表面活性剂,在合适浓度下它能溶解膜蛋白,破细胞膜,可改变质粒在细胞膜上的结合位点,使其不能精确复制,并最终导致质粒不能正确地分配到子细胞中,从而达到消除质粒的目的<sup>[19]</sup>. 相比与吡啶橙、溴乙啶等可致癌的化学消除剂, SDS 是安全可靠的常用的化学消除剂.

本文通过质粒消除的方法得到 JA1-6 和 JA1-9 两个稳定的对卡那霉素敏感的突变菌株. 在进一步研究中,可以直接利用 JA1-6 和 JA1-9 两菌株作为实验材料,而卡那霉素抗性则可作为筛选标记应用在高通量的筛选中. JA1-6 和 JA1-9 对卡那霉素敏感,但仍具氨苄青霉素、安普霉素和链霉素抗性,推测卡那霉素的抗性基因在质粒上,而氨苄青霉素、安普霉素和链霉素的抗性基因可能在细菌的染色体上.

有报道指出很多有机污染物降解菌的污染物降解特性是由菌体细胞内的质粒控制的,或者与质粒有关<sup>[20-22]</sup>. 在本实验中,质粒消除后, JA1 菌株烟酸脱氢酶酶活性没有变化,推测 JA1 菌株质粒上并不携带编码烟酸脱氢酶的基因,因此该基因的筛选还应该从基因组 DNA 入手.



M: λEcoT14 I 标准相对分子质量参照物;0:JA1;1-12:菌落 1-12

图 1 JA1 菌株 SDS 消除后菌落质粒 DNA 的检出

Fig.1 Plasmid detection of the strains generated by SDS treatment of JA1

[参考文献]

- [1] Yoshida T, Nagasawa C. Enzymatic functionalization of aromatic N-heterocycles hydroxylation and carboxylation[J]. J Biosci Bioeng 2000, 89(2): 111-118.
- [2] Fetzner S. Bioconversion of pyridine by resting cells of quinoline-degrading bacteria[J]. FEMS Microbiol Letters 1999, 176(1): 291-299.
- [3] Uchida A, Yoshida T, Ogawa M, et al. Regioselective hydroxylation of quinoline, indoline and isocinchomeric acid by resting cells of pyridine dicarboxylic acid-degrading microorganisms[J]. Appl Microbiol Biotechnol 2003, 62(4): 337-341.
- [4] Kulla H G. Enzymatic hydroxylations in industrial application[J]. China (Arau), 1991, 45(1): 81-85.
- [5] Nagasawa T, Huh B, Yamane T. Production of 6-hydroxynicotinic acid from nicotinic acid by resting cells of *Pseudomonas fluorescens* TN5[J]. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(4): 665-668.
- [6] Huh B, Ohshima M, Yamane T, et al. Microbial production of 6-hydroxynicotinic acid, an important building block for the synthesis of modern insecticides[J]. J Ferment Biopeng in 1994, 77(4): 382-385.
- [7] 陆伟宏, 徐莉, 戴亦军, 等. 一株烟酸羟基化转化菌株的筛选和鉴定[J]. 微生物学报, 2005, 45(1): 6-9.
- [8] 陆伟宏, 袁生, 徐莉, 戴亦军. 恶臭假单胞菌 NA-1 菌株烟酸羟基化酶活性的诱导和转化条件的研究[J]. 微生物学报, 2005, 45(4): 551-555.
- [9] Ashraf A, Daniel J, Nadine W, et al. Molecular and functional analysis of nicotinate catabolism in *Eubacterium barkeri*[J]. PNAS 2006, 103(33): 12341-12346.
- [10] HUNT A L. Purification of the nicotinic acid hydroxylase system of *pseudomonas fluorescens* KBI[J]. Biochem J 1959, 72(1): 1-7.
- [11] Dilworth G L. Properties of the selenium-containing moiety of nicotinic acid hydroxylase from *clostridium barkeri*[J]. Arch Biochem and Biophys, 1982, 219(1): 30-38.
- [12] Huh B, Yamane T, Nagasawa T. Purification and characterization of nicotinic acid dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens* TN5[J]. Ferment Biopeng in 1994, 78(1): 19-26.
- [13] 周红, 王浴王. 用十二烷基磺酸钠消除耐阿洛西林绿脓杆菌质粒[J]. 中国抗生素杂志, 1992, 34(3): 237-239.
- [14] Mohar J, Folkeak S, Nakamura M J, et al. Antiplasmid activity: loss of bacterial resistance to antibiotics[J]. JPM IS Suppl 1992, 30(1): 24-31.
- [15] Amaral L, Lorian V. Effects of chlorpromazine on the cell envelope proteins of *Escherichia coli*[J]. Antimicrob Agents Chemother 1999, 3(4): 6.
- [16] Yuan S, Yang Y, Sun J, et al. A combined technology of growing culture hydroxylation of nicotinic acid and resting cells hydroxylation of 3-cyanopyridine by *Comamonas testosteroni* JA1[J]. Engineering in Life Sciences 2005, 5(4): 369-374.
- [17] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 2版. 北京: 科学出版社, 1999.
- [18] 陆伟宏, 袁生, 戴亦军. 烟酸微生物转化产物的高效液相色谱分析方法[J]. 江苏农业科学, 2004, 3(1): 90-92.
- [19] 姜恺, 班睿, 赵学时. 细菌质粒的消除[J]. 微生物学通报, 2002, 29(5): 99-102.
- [20] Burton N F, Day M J, Bull A T. Distribution of bacterial plasmids in clean and polluted sites in a South Wales river[J]. Appl Environ Microbiol 1982, 44(5): 1026-1029.
- [21] De J, Ramiah N, Mesquita A, et al. Tolerance to various toxicants by marine bacteria highly resistant to mercury[J]. Mar Biotechnol 2003, 5(2): 185-193.
- [22] 张素琴, 赵姬勇, 马国华, 等. 污染环境中的细菌质粒的研究[J]. 生态学报, 1990, 10(4): 338-341.

[责任编辑: 孙德泉]