

绿色荧光蛋白标记的嗜水气单胞菌 在温暖水体的存活及稳定性

张庆华 陈 营 陆承平

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 南京 210095)

摘要: 用绿色荧光蛋白基因(GFP)标记嗜水气单胞菌 4332 株(Ah4332^{GFP}), 检测其在温暖水体中的存活及稳定性。在灭菌自然塘水中, Ah4332^{GFP}存活 47d 之久, 该菌浓度随时间而变化, 呈现两个峰值; 在非灭菌自然塘水中, Ah4332^{GFP}存活 18d, 该菌浓度均随时间延长呈下降趋势。表明 Ah4332^{GFP} 和天然细菌之间的相互作用影响其稳定性。用 M9 培养基检测 Ah4332^{GFP} 质粒的稳定性, 结果显示在传代培养 40、70 代后, 质粒稳定率分别保持在 47.3% 和 20.5%。可见 pGFP 是一种相对稳定的质粒, Ah4332^{GFP} 可用于微生物生态的研究。

关键词: 绿色荧光蛋白; 嗜水气单胞菌; 稳定性

中图分类号: Q939.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2001)03-0251-06

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Stanier Ah)为水中常见细菌, 其致病菌株引起鱼病, 造成水产养殖业巨大损失^[1]。除采取药物及疫苗等防治措施外, 研究 Ah 在水体的生态变化, 可为从根本上解决问题提供重要依据。1994 年 Chalfie 等^[2]首次在大肠杆菌细胞中表达了能发出绿色荧光的绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)基因, 开创了 GFP 研究与应用之先河。GFP 标记系统不需外源性底物及辅助因子, 无毒、稳定, 可以在紫外光(UV)或蓝光照射下直接观察, 近年来受到微生物学家的普遍重视。本试验成功地构建了含 GFP 质粒的标记菌株 Ah4332^{GFP}, 在此基础上研究其在水体中的存活及稳定性, 对 Ah 的生态学作了有意义的探讨。

1 材料与方法

1.1 菌株 供体菌为大肠杆菌(*Escherichia coli*, Ec) DH5α(pGFPuv), pGFPuv(3.3kb) 为 Clontech Laboratories 公司产品; 受体菌为嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*, Ah) 4332 株, 自犊牛分离, 对氨苄青霉素(Amp)敏感。均由德国吉森大学动物卫生所 Baljer 教授惠赠。

1.2 GFP 标记 Ah4332 菌株的构建 细菌感受态的制备与冻存、质粒 DNA 的提取和快

收稿日期: 1999-02-12; 修订日期: 2000-09-30

基金项目: 国家“九五”攻关项目子课题(96-005-03-01)

作者简介: 张庆华(1972-), 女, 河北省沧州市人; 硕士; 现在上海水产大学工作, 主要从事鱼病研究

通讯作者: 陆承平。夏晓勤博士在图表处理中给予帮助, 特此致谢

速检测以及细菌的转化均按 Sambrook 等^[3]的方法进行。质粒转化用酶购自华美公司, 胰蛋白胨和酵母浸出物为 Unipath 公司产品, 注射用氨苄青霉素为山东济南齐鲁制药厂产品, 用无菌双蒸水配成 100 μ g/ μ L 的储备液, -20℃保存, 工作浓度为 100 μ g/mL。

1.3 Ah4332^{GFP}的鉴定 配制改良 TSA 培养基(g/L): 胰蛋白胨 7, 酵母浸出物 6, 葡萄糖 4.5, 氯化钠 5, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 3.3, 琼脂 20; 调 pH 7.5, 115℃高压灭菌 20min)。将标记的 Ah4332^{GFP} 接种于上述培养基, 28℃24h, 挑取单个菌落作革兰氏染色, 镜检。半固体穿刺法检查运动性。用纸片法作氧化酶(1% 盐酸四甲基对苯二胺, 南京市医药公司) 试验; 生化试验用葡萄糖、麦芽糖、七叶苷、 H_2S 等 15 种微量生化发酵管(上海市医学化验所试剂厂), 28℃培养 48h, 观察结果。上述试验设未标记的 Ah4332 为对照(表 1)。

1.4 Ah4332^{GFP}在温暖水体的存活试验 参照 Leff 等^[4]的方法, 略有改动。取南京农大某池塘内自然水样, 检测以下指标: 水温 24±2℃, pH 6.6±0.2, 溶氧(DO) 7.3mg/L, Ca^{2+} 239.76mg/L, Mg^{2+} 102.91mg/L, $NH_4^+ - N$ 1.1025mg/L, $NO_3^- - N$ 0.0143mg/L, $NO_2^- - N$ 0.0006mg/L, 化学耗氧量(CODcr) 54.89mg/L。将此水样 2000mL 分作 4 份, 每份 500mL。其中两份高压灭菌(121℃, 20min), 另两份不灭菌。灭菌组中再分 A、B 两组, B 组无 Amp, A 组则添加 Amp(100 μ g/mL) 作为选择压力。非灭菌组同样分两组, D 组为不加 Ah4332^{GFP} 的空白对照。将 Ah4332^{GFP} 在 TSB(成分同改良 TSA, 不含琼脂, 但含 100 μ g/mL Amp) 培养基中振荡培养 16h, 取菌液 0.5mL 分别加入 A、B、C 组水样, 装有上述 4 组水样的三角烧瓶置光线透过良好处, 28℃摇床缓慢摇动, 以模拟自然水体的状态。每 24h 取样培养一次, 涂 TSA 平板, 28℃培养 24h, 用手提式紫外检测仪(ZFP 型, 上海长明光学电子仪器厂) 检测绿色的菌落(CFU), 直至检测不到发绿色荧光的菌落为止。D 组用以检测水中是否有其他荧光细菌的存在。

1.5 GFP 质粒的稳定性试验 参照王扬等^[5]报道的方法, 先将 Ah4332^{GFP} 在含 Amp 的 TSB 培养基 28℃培养 18h, 然后接种于无选择压力的 M9 培养基^[5] 28℃孵育。每 24h 转接一次, 24h 为 10 代。接种量为总体积的 1/1000, 涂布于不含 Amp 的 TSA 平板, 紫外光(UV)下计发绿色荧光和不发绿色荧光的细菌菌落数, 计算质粒的稳定率和丢失率(%)。计算公式为稳定率= 绿色菌落数/菌落总数 × 100%, 丢失率= 不绿菌落数/菌落总数 × 100%。

2 结果

2.1 标记 Ah4332^{GFP}的构建

供体菌 Ec DH5 α (pGFP_{UV}) 中的 pGFP 质粒 DNA 转化受体菌 Ah4332, 在含 Amp 的平板上筛选到发绿色荧光的 Ah4332^{GFP}。琼脂糖凝胶电泳的质粒图谱显示, Ah4332^{GFP} 比 Ah4332 多的条带正是供体菌 Ec DH5 α (pGFP_{UV}) 所提供的 pGFP 的条带(图 1)。

2.2 Ah4332^{GFP}的鉴定

Ah4332^{GFP} 是革兰氏阴性短杆菌, 无荚膜, 不形成芽孢, 有运动力。在 TSA 上生长呈光滑、圆整、湿润的淡绿色或绿色菌落, 在 UV 照射下发亮绿色荧光, 菌落直径 2—3mm。因其本身绿色, 氧化酶试纸是否变色无法判定。发酵葡萄糖、甘露糖产酸; 发酵麦芽糖、乳糖产酸产气; 不发酵蔗糖、阿拉伯糖; 精氨酸双水解酶、赖氨酸脱羧酶、苯丙氨酸脱氨酶、尿

素酶、七叶苷、西蒙氏枸橼酸盐、侧金盏花醇、卫茅醇反应阴性(表 1)。

2.3 Ah4332^{GFP}在温暖水体的存活时间

Ah4332^{GFP}加入灭菌水体 47d 后, B 组该菌浓度为 15CFU / mL, 加 Amp 的 A 组已检测不到活菌。水中的该菌浓度随时间而变化, A、B 两组的变化趋势大致相同, 在 4—6d 内出现第一个峰值, 在 14—146d 内出现第二个峰值, 但 A 组的两个峰值较 B 组偏高(图 2)。在非灭菌水体中, C 组的 Ah4332^{GFP}在 18d 后不再检出, 该菌浓度随时间延长呈下降趋势。D 组未检测到发绿色荧光的细菌, 其所含的非绿色荧光菌落明显少于 C 组, C、D 两组原有的天然细菌的菌数也随时间的延长而下降(图 3)。

2.4 pGFP 的稳定性

Ah4332^{GFP}在 M9 培养基中传代时, 至第 10 代出现 pGFP 的丢失, 丢失率为 40.5%, 至第 120 代 pGFP 的丢失率达 98.2% (表 2)。

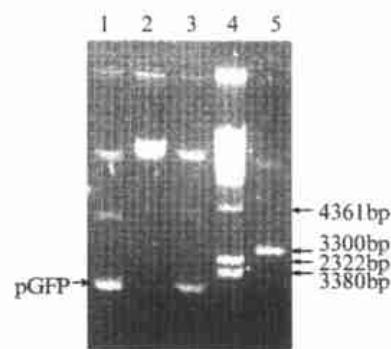


图 1 质粒电泳(0.7%琼脂糖)图谱

Fig. 1 0.7% agarose gel electrophoretic pattern of plasmid DNA

1: GFP 标记的 Ah4332 (4332^{GFP}) 菌株; 2: Ah4332 菌株; 3: EcDH5α (pGFP_{UV}) 菌株; 4: λDNA/HindIII 标准分子量; 5: 经 BamH I 酶切的 Ec DH5α (pGFP_{UV}) 菌株。
lane 1: GFP marked Ah4332 (4332^{GFP}) strain;
lane 2: Ah4332 strain; lane 3: Ec DH5α (pGFP_{UV}); lane 4: marker of λDNA/HindIII;
lane 5: Ec DH5α (pGFP_{UV}) / BamH I

表 1 Ah4332^{GFP}和 Ah4332 菌株的生理生化特性比较

Tab. 1 Comparison of physiological and biochemical characteristics of Ah4332^{GFP} and Ah4332 strain

特性	Characteristics	Ah4332 ^{GFP}	Ah4332	特性	Characteristics	Ah4332 ^{GFP}	Ah4332-
运动性	Motility	+	+	乳糖	Lactose	⊖	+
氧化酶	Oxidase	±	+	甘露糖	Mannitol	+	+
过氧化氢酶	Catalase	+	+	阿拉伯糖	Arabinose	—	—
明胶酶	Gelatin	—	—	精氨酸双水解酶	Arginine Dihydrolase	—	—
吲哚	Indole	+	+	赖氨酸脱羧酶	Lysine Decarboxylase	—	—
MR		+	+	苯丙氨酸脱氨酶	Phenylalanine Deaminase	—	—
VP		—	—	尿素酶	Urease	—	—
H ₂ S		+	+	七叶苷	Ac esculin	—	—
葡萄糖	Glucose	+	+	枸橼酸盐	Citrate	—	—
麦芽糖	Maltose	⊖	⊖	侧金盏花醇	Adonitol	—	—
蔗糖	Sucrose	—	—	卫茅醇	Dulcitol	—	—

注: ⊖产酸产气 Acid and gas; + 产酸 Acid; — 反应阴性 Negative; ± 反应不定 A void unstable

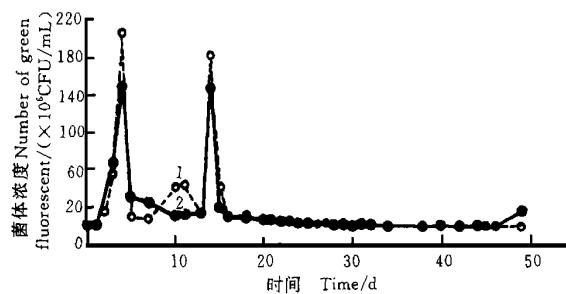


图 2 灭菌水体中菌体浓度随时间变化曲线

Fig. 2 Changes of cell concentration in the autoclaved water
 —○—A Ah4332^{GFP}+ Amp; —●—B Ah4332^{GFP}

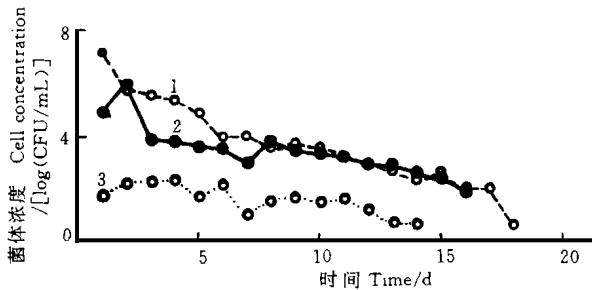


图 3 非灭菌水体中菌体浓度随时间变化曲线

Fig. 3 Changes of cell concentration in the natural pond water
 —○—C^{GFP+} C 组绿色菌落数; —●—C^{GFP-} C 组非绿色菌落数;
 —○—D D 组天然菌落数

表 2 质粒 pGFP 的稳定性

Tab. 2 Stability of GFP plasmid

传代数 Number of generations	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
绿色荧光菌落数 Number of green fluorescent colony	210	138	188	225	251	231	137	85	77	44	52	24
总菌数 Total number of colony	353	274	391	476	645	786	669	643	665	811	996	931
稳定性 Rate of stability	59.5	50.4	48.1	47.3	38.9	29.4	20.5	13.2	11.6	5.4	5.2	1.8
丢失率 Rate of curing	40.5	49.6	51.9	52.7	61.1	70.6	79.5	86.8	88.4	94.6	94.8	98.2

注: 表中数据为三次实验的总和 The data in the table were the total number of three tests

3 讨论

水体和水生动物中的细菌尤其是致病菌的动态分布及其存活时间, 值得关注。以往

的报道多局限于细菌种类和数量的分析, 问题在于, 同一种细菌, 不同时间检测出的是否是相同的菌株, 没有分子标记, 难以断定, 这正是制约微生物生态学研究的“瓶颈”之一。尽管放射性同位素标记可供使用, 但弊端较多, 难以普及。本试验采用先进的绿色荧光蛋白标记系统, 用于 Ah 在水体中的存活及稳定性研究, 是一个方法学的突破, 具有一定的普遍意义。

Ah 在温暖淡水水体及水生动物中经常检出^[6], 但它在水中究竟能活多久, 未见确切报道。本试验表明, 标记的 Ah 在适合温水鱼生活的水质及水温条件下, 在灭菌水体中比非灭菌水体中存活时间长 29d, 原因之一是高压灭菌增强了分解性有机碳的不稳定性, 为细菌提供了更好的碳原^[4]。而且非灭菌水体中由于标记菌的存在, 检测到的非绿色菌落数明显多于 D 组中的天然细菌数, 提示 Ah 与水体天然细菌之间具有相互作用, 探讨这种相互影响的复杂关系, 令人向往。

Ah4332^{GFP} 与 Ah4332 相比除标记菌氧化酶试验不能判定外, 其他各项生化指标完全相同, 说明 pGFP 的表达不影响宿主菌的基本特性, 标记菌株 Ah4332^{GFP} 可以作为水中生态变化的指示菌。

重组质粒一般缺乏稳定因子和像自然质粒那样的控制因子, 外源基因要表达蛋白质, 消耗宿主细胞的营养物、能量及相关酶等, 是宿主细胞的额外负担, 即蛋白质负担(Protein burden)^[7], 所以重组质粒有可能不稳定。灭菌水体添加 Amp 的 A 组对于具 Amp 抗性的 pGFP 的表达具有选择压力, 则 Ah4332^{GFP} 的数量比不添加 Amp 的 B 组多, 表现为 A 组细菌浓度的两个峰值均高于 B 组。营养条件也是 GFP 表达的重要因素之一。据 Leff 等^[4] 报道, 在低营养条件下的河水中, pGFP 质粒可能会丢失或不表达。据王扬^[5] 报道 Ec HB101(pEC302) 在营养成分相对贫乏的 M9 培养基中传代培养 40 代, pEC302 几乎没有丢失, 认为很稳定。毛牧灵等^[8] 报道的 Ec G3-1(pSJM3) 在 M9 培养基传 70 代后, pSJM3 稳定率保持 97% 以上, 认为稳定。本试验所用 pGFP 质粒在 M9 培养基传代培养 40、70 代后, 质粒稳定率分别为 47.3% 和 20.5%, 在低营养的非灭菌塘水中 18d 仍检测到, 可认为 Ah4332^{GFP} 中的 pGFP 是一种相对稳定的质粒。

参考文献:

- [1] 陈怀青, 陆承平. 家养鲤科鱼暴发传染病的病原研究[J]. 南京农业大学学报, 1991, 14(4): 87—91
- [2] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression [J]. *Science*, 1994, 263(11): 802—805
- [3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (second edition) [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [4] Leff L G, Leff A A. Use of green fluorescent protein to monitor survival of genetically engineered bacteria in aquatic environments [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 9:3486—3488
- [5] 王扬, 张志毅, 杨胜利, 等. Par 区域的克隆及其对质粒 pUC9 稳定性的影响[J]. 生物工程学报, 1992, 8(2): 134—139
- [6] 凌红丽, 陆承平, 陈怀青, 等. 嗜水气单胞菌检验程序的研究[J]. 中国动物检疫, 1998, 15(3): 1—3
- [7] Kurland C G, Dong H. Bacterial growth inhibition by overproduction of protein [J]. *Molecular Microbiology*, 1996, 21(1): 1—4
- [8] 毛牧灵, Lassana T B, 沈萍, 等. 含 par 位点的重组质粒 pSJM3 的构架及其稳定性研究[J]. 生物工程学报,

1998, 14(1): 64—69

SURVIVAL AND STABILITY OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN MARKED (GFP— MARKED) *AEROMONAS HYDROPHILA* IN WARM WATER

ZHANG Qing- hua, CHEN Ying and LU Cheng- ping

(Key Lab of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract The survival and stability of *Aeromonas hydrophila* (Ah) strain 4332^{GFP} marked with green fluorescent protein plasmid (pGFP) in the warm water was tested. The results showed that Ah4332^{GFP} survived 47 d and the number of green fluorescent cells (GFCs) had two peaks in the autoclaved pond water. In the natural pond water, Ah4332^{GFP} survived 18 d, but the number of GFCs declined during the experimental period. It suggested that Ah4332^{GFP} and the natural bacteria in the pond water interacted and affected the stability of marked bacteria. In the medium M9, Ah4332^{GFP} strain could culture to 40 and 70 generations and the rates of stability of pGFP were 47. 3% and 20. 5%, respectively. It concluded that pGFP had relative stability and Ah4332^{GFP} could be applied to bacterial ecology survey.

Key words: Green fluorescent protein (GFP); *Aeromonas hydrophila* (Ah); Stability