

摘 要

多环芳烃 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) 是一大类具有毒性, 致畸变和致癌特性的环境有机污染物。很多高分子量的多环芳烃由于与土壤基质的强烈吸附限制了其生物可利用性, 很难在土壤中被生物降解, 造成严重的环境污染。

生物表面活性剂和表面活性剂一样含有一个亲水基团和一个亲脂基团。大量文献研究表明生物表面活性剂对多环芳烃类有机污染物具有解吸和增溶作用, 从而提高疏水性有机污染物的生物可利用性, 提高降解效能。

本文通过筛选生物表面活性剂产生菌、蕈高效降解菌和黄麻根际优势菌, 分别进行抗性或 GFP 标记, 研究其原生质体形成与再生的最佳条件。通过原生质体电融合得到即能产生生物表面活性剂、又能高效降解多环芳烃蕈且在根际旺盛生长的两类稳定融合子。为以后再定殖回根际, 在黄麻根际构建一个耦合的降解系统奠定基础。用以研究生态干预根际微生境的方法提高对污染物的降解能力、促进土壤净化和减少植物对污染物的吸收, 为污染土壤的修复提供科学依据。主要研究内容包括:

1. 以铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 为出发菌株, 测定其生长曲线, 根据其生长周期研究原生质体形成和再生的最佳条件: 取培养到对数生长期前期的细胞, 在溶菌酶终浓度为 1mg/ml。酶解时间在 0.5h 制备的原生质体形成率和再生率均较高。通过 Co^{60} 辐射诱变得大量的突变菌株, 再通过血平板筛选, 排油性能和表面张力的测定, 得到 5 株产表面活性剂能力强同时又具有多种抗性标记的突变株。然后通过薄层层析证明铜绿假单胞菌产生的生物表面活性剂为糖脂。

2. 从染料厂废水污泥中分离出两株蕈降解菌, 对这两株菌进行富集培养, 驯化其降解性能并通过紫外诱变得在蕈为唯一碳源平板上生长良好的突变株 AN-1' 和 AN-2'。同时对 AN-2' 进行原生质体制备和再生的研究。得到最佳条件为: 取其培养到对数生长早期的菌液, 在溶菌酶终浓度为 2mg/ml。酶解时间 0.5h 制备的原生质体, 其形成率可达 82.2% 而再生率也较高为 22.1%。

3. 从 *E.coli*DH5 α F' /pUC-GFP 提取质粒转化根际优势菌 Tu-1 和 Tu-7。根据转化子的荧光特性表明 *E.coli*pUC-GFP 质粒已转入 Tu-1 和 Tu-7，而且 GFP 基因能在其中表达。

对 EGFP 基因进行 PCR 扩增。扩增产物用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后 Klenow 酶大片段进行填平，然后与含有 Tn5 转座子的质粒 pTnMod-Ocm 进行平头连接，转化 Tu-1 和 Tu-7 感受态，在 Tu-1 中得到转化子，在自然光下就可见到明亮的绿色。

4. 把标记好的生物表面活性剂和葱高效降解菌分别与带有 GFP 基因标记的 Tu-1 进行电融合。在交流电场强度 30V/cm；交流频率 500KHz；脉冲强度 450V/cm；脉冲宽度 5 μ s；脉冲个数为 2 的条件下。得到融合子 2 株。

关键词：多环芳烃 原生质体 形成率 再生率 电融合
转化 生物表面活性剂 绿色荧光蛋白

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a large class of environmental organic pollutants that exhibit toxic, mutagenic, or carcinogenic to organisms. And high-molecular-weight PAH resist extensive bacterial degradation in soil and sediment media. The recalcitrant behavior can be attributed to the limited bioavailability of PAH strongly adsorbed onto soil organic matter.

Biosurfactants have hydrophilic and hydrophobic groups as chemical surfactants. Many paper presents better results of biosurfactant on the desorption of various PAHs compounds in the aqueous and soil system and it will be useful for further biodegradation or chemical degradation.

By protoplast electric fusing we found two fusants. The one came from a bacteria with highly efficiency to biodegrade anthracene (a PAH with three fused aromatic rings) and a bacteria in jute rhizosphere. The another came from a bacteria producing biosurfactant and a bacteria in jute rhizosphere. And the fusants colonizing on jute roots will construct a coupling system for degrading contaminant.

1. And *Pseudomonas aeruginosa* which can produce biosurfactant was used as initial strains to carry out the research on protoplast mutagenesis electric fusion and transformation. The growth rate of the strain was tested and the cultures at exponential growth phase were used for protoplast preparation. The optimum conditions of protoplast preparation is that cells in the early log stage, lysozyme concentration is 1mg/ml, lysis duration is 30 min and the regeneration ratio is above 46% in such conditions. 73 mutagenesis with antibiotic marking were gained by Co^{60} mutagenesis. And five strains were isolated with higher surface activity from mutagenesis.

2. Two effective strains EN-1 and EN-2 were isolate from the sludge which had been contaminated by dye waste water for a long time. Before isolation, the anthracene was used to cultivate for seven weeks as the sole carbon source and its concentration adding to the cultivating system was increased up to 100 mg/L

gradually. The testing results show that two isolates can transform and degrade anthracene. And the condition of protoplast formation and regeneration of protoplast of AN-2' were reported. The results indicated that cells in the early log stage, 2mg/ml lysozyme for 30min are the most appropriate for the formation and regeneration of the protoplast of AN-2'.

3. Seven strains were screened from jute rhizosphere by petroleum hydrocarbon polluting. Tu-1 and Tu-2 grow activity .

The plasmid harboring GFP gene was transferred into P₅₋₂₃,P₅₋₂₄,P₇₋₅₀ and Tu-1, respectively, and the resulting transformants were obtained with the overexpression of GFP and appeared bright green under blue light.

By PCR and DNA recombination in vitro, EGFP gene was combined with plasmid pTnMod-Ocm which contains the mini-Tn5. And the recombined plasmids was transformed into Tu-1 successfully and could EGFP express in it based on the fluorescent character.

4. The Tu-1/gfp cell and AN-2',P₇₋₅₀ were used to study the optimal condition of cell protoplast electronfusion. The results showed the appropriate condition was 500KHz, 30V/cm for AC field and 450V/cm, 5 μ s, 2 nops for DC field. The strength of DC was the most important parameter for protoplast fusion frequency. The study supplied condition data for fusants.

Key words: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PHAs) Protoplast
Preparation Regeneration Electronfusion Transformation
Biosurfactant Green fluorescent protein (GFP)

目 录

□ 文摘

□ 英文文摘

□ 第一章前言

- 1. 多环芳烃(PAHs)污染现状及微生物降解
- 2. 生物表面活性剂的研究进展
- 3. 根部定殖的定义、方法和发展以及绿色荧光蛋白标记
- 4. 原生质体的研究进展及电融合技术
- 5. 课题设计

□ 第二章生物表面活性剂产生菌的标记及原生质体制备

□□ 1. 引言

□□ 2. 材料

□□ 3. 方法

□□□ 3.1 细胞特性的检测

□□□ 3.2 原生质体的制备与再生

□□□ 3.3 原生质体的观察方法

□□□ 3.4 原生质体诱变

□□□ 3.5 产表面活性剂能力的测定

□□□ 3.6 生物表面活性剂化学分析

□□ 4. 结果与分析

□□□ 4.1 菌株的生长曲线

□□□ 4.2 原生质体形态的显微观察

□□□ 4.3 不同生长期的细胞对原生质体形成及再生的影响

□□□ 4.4 酶浓度和酶解时间对原生质体的影响

□□□ 4.5 原始菌株及其原生质体诱变

□□□ 4.6 标记菌株产表面活性剂能力的测定

□□□ 4.7 生物表面活性剂化学结构分析

□□ 5. 小结

□ 第三章蒽细菌的分离纯化及原生质体制备

□□ 1. 引言

□□ 2. 材料

□□ 3. 方法

□□□ 3.1 蒽降解细菌的分离纯化

□□□ 3.2 紫外诱变育种

□□□ 3.3 分离菌株生长曲线的测定和形态观察

□□□ 3.4 蒽浓度的测定

□□□ 3.5 原生质体的制备与再生

□□ 4. 结果与分析

□□□ 4.1 蒽降解菌的分离与形态观察

□□□ 4.2 蒽降解菌诱变

□□□ 4.3 突变菌株对蒽降解效果的测定

□4.4	菌株的生长曲线
□4.5	蕈降解菌的原生质体制备条件
□5.	小结
□第四章	根际土生优势菌的分离与绿色荧光蛋白标记
□1.	引言
□2.	材料
□3.	方法
□3.1	黄麻人工体系的构建
□3.2	人工模拟污染土壤
□3.3	根际优势菌株的分离
□3.4	生长曲线的测定
□3.5	EGFP 基因的克隆与表达
□3.6	重组 DNA 的转化
□4.	结果与分析
□4.1	黄麻根际优势细菌的分离与筛选
□4.2	Tu-1 和 Tu-7 菌株生长曲线
□4.3	基因 EGFP 的 PCR 扩增
□4.4	重组质粒的构建
□4.5	GFP 和 EGFP 基因的表达
□5.	小结
□第五章	标记菌株电融合及融合子的筛选
□1.	引言
□2.	材料
□3.	方法
□3.1	原生质体的制备
□3.2	原生质体的电融合
□3.3	融合子检出及测定
□4.	结果与分析
□4.1	融合子选择平板的确定
□4.2	高频交流电场对原生质体电融合的影响
□4.3	直流脉冲对原生质体电融合的影响
□4.4	原生质体电融合的观察
□4.5	融合子的筛选与性状测定
□5.	小结
□	主要参考文献
□	致谢

第一章 前言

1. 多环芳烃 (PAHs) 污染现状及微生物降解

多环芳烃 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons ,PAHs) 是一类广泛分布于环境中的含有两个或两个以上苯环的有机化合污染物。它们都是电子共轭体, 具有结构稳定, 难生物降解的性质, 且大多有致癌、致畸、致突变特性。随着苯环数量增加, 其脂溶性越强, 水溶性越低, 在环境中存在时间越长, 遗传毒性越高, 其致癌性也随着苯环数的增加而增强^[1]。PAHs 是石油、煤、木材、可燃气体等含碳氢化合物的物质在不完全燃烧过程中, 或是在还原气体中进行热分解产生, 它们在 1977 年美国环保局公布的 129 种优先污染物中占 16 种^[2,3], 而且全部属于一级污染物, 即是具有长效性和累积效应, 不能挥发的有毒污染物。现代石化和焦化工业及矿物燃料的大量使用, 加剧了多环芳烃的产生和分布, 使之成为全球性的环境污染物。

1.1 降解多环芳烃的微生物

许多细菌、真菌及藻类都具有降解多环芳烃的能力。一般来说, 随着多环芳烃苯环数量的增加, 其降解速率越低。因此, 低分子量的多环芳烃在环境中能较快被降解, 在环境中存在的时间越短, 而高分子量的多环芳烃则难于降解, 较长期存在于环境中。研究表明, 许多微生物能以低分子量多环芳烃作为唯一碳源和能源, 并将其完全无机化。但高分子量的多环芳烃, 由于其自身的结构和特性, 在环境中较稳定, 能矿化多环芳烃并以其作为唯一碳源和能源的细菌的研究报道较少, 白腐真菌对 PAHs 降解作用的研究较多。许多四环或四环以上高分子量多环芳烃的矿化作用一般以共代谢的方式进行。

假单胞菌属细菌 (*Pseudomona.Sp*) 含有编码降解复杂有机物酶基因的质粒, 对有机污染物有强降解力。蓝黑色杆菌 (*Chromobacterium lividum*) 是降解农药、除莠剂的有效菌株。此外, 降解章鱼肉碱的农杆菌属、分解聚氯联苯的红酵母属 (*Rhodotorula*)、克氏杆菌属 (*klebsiella*)、不动杆菌

属 (*Acinetobacter*)、降解合成聚酯化合物的青霉(*Penicillium*)等等均能降解难降解的有机污染物。

1.2 多环芳烃的微生物降解方式

原核生物和真核生物对多环芳烃的微生物降解都需要氧气的参与，产生氧化酶，使苯环降解。因此，多环芳烃苯环的降解取决于微生物产生加氧酶的能力，且由于酶对于多环芳烃降解的专一性，环境中多环芳烃的多样性，多环芳烃的降解需要多种微生物参与。微生物加氧酶有两种，即单加氧酶和双加氧酶。丝状真菌一般产生单加氧酶，对多环芳烃降解的第一步是羟基化多环芳烃，即把一个氧原子加到底物中形成芳烃化合物，继而氧化为反式双氢乙醇和酚类；细菌主要产生双加氧酶，对多环芳烃降解的第一步是苯环的裂解，把两个氧原子加到底物中形成双氧乙烷，进一步氧化成顺式双氢乙醇，双氢乙醇可继续氧化为儿茶酸、原儿茶酸和龙胆酸等中间代谢物，接着苯环断开，产生琥珀酸、延胡索酸、乙酸、丙酮酸和乙醛^[4-5]。降解中的产物被微生物用来合成自身的生物量，同时产生 CO₂ 和 H₂O。多环芳烃最初的氧化即苯环的加氧是多环芳烃微生物降解反应的速控步骤，此后降解进程加快，没有或很少有中间代谢物的积累。多环芳烃的酶降解具有很强的区域性和选择性。在环境中，还存在着其他多环芳烃降解机制，如甲烷单氧酶、几丁质超氧化酶等酶代谢。

多环芳烃的无氧降解海洋沉积环境中多环芳烃的有氧降解已有了广泛的研究。然而大部分有机物富集的海洋沉积环境处于无氧条件，越来越多的研究对多环芳烃在无氧条件下分解感兴趣。研究表明，在反硝化的条件下，多环芳烃可以发生无氧降解，以硝酸盐作为电子受体。在硫酸盐还原环境，多环芳烃的微生物降解仍然存在，以硫酸盐作为电子受体，可以降解萘、菲、荧蒹等等。

1.3 多环芳烃污染土壤的生物修复

生物修复的本质是对难降解污染物的生物降解，其强化措施可概括为生物促进 (Biostimulation) 和生物强化 (Bioaugmentation) 两种。

生物促进是为微生物的降解作用创造良好的环境条件，从而提高微生物

物的降解能力和降解速率。更有效去除污染物，修复污染环境。生物促进的方法是多样的，如向生物修复系统施加微生物生长的营养盐或生长促进剂；提供污染物氧化分解所需的电子受体；加入能导致共代谢难降解污染物的底物以及加入各种表面活性剂来促进降解作用。营养盐的缺乏是限制微生物活性的重要因素，为使污染物达到完全的降解，适当添加营养物可以明显地促进污染物的降解。Grosser 等^[9]报道，从受多环芳烃污染的土壤中分离细菌，培养 2d 后，再回到土壤中，芘的降解速率提高了 55%，此时每克土壤中的细菌高达 10^6-10^8 个。多环芳烃的解吸是决定其降解程度的关键因素。表面活性剂通过降低多环芳烃在环境中的毛细管张力和提高其在水中的溶解度，多环芳烃从固相转移到水相，促进了多环芳烃的生物利用率^[6]。Arino^[7]、Deziel 等^[8]发现，微生物在降解多环芳烃过程中自身能产生以糖脂形式存在的生物表面活性剂，促进多环芳烃的降解和微生物的生长。生物表面活性剂乳化能力高于化学表面活性剂，且由于微生物自身产生，可大大降低处理成本，不会产生二次污染，已得到广泛的重视。

生物强化是通过加入具有特殊作用的高效降解微生物补充或替代原存的土生微生物，从而优化降解微生物的群落结构。增加具有降解作用微生物的生物量。增强了污染环境中的污染物的降解反应，提高降解活性和速率。随着分子生物学技术的发展，采用细胞融合技术等遗传工程手段可以将多种降解基因转入同一微生物中，使之获得广谱的降解能力，即合成基因工程菌（Genetically Engineered Microorganisms GEM）。多环芳烃在沉积物中多以混合物存在，可把从小分子量多环芳烃降解菌中提取的质粒融合到大肠杆菌上，使其具有降解多环芳烃的能力。

2. 生物表面活性剂的研究进展

表面活性剂含有一个亲水基团和一个亲脂基团，亲脂基团通常是碳氢化合物，而亲水基团则是带正电、负电或两性的基团。乙氧基化合物、氧化乙烯、山梨酸糖脂等都是常见的非离子型表面活性剂，脂肪酸、磺酸盐和季胺盐等都是常见的离子型表面活性剂。由于同一分子中具有亲脂和亲水基团，表面活性剂趋向于液相与另一种极性和氢键力不同的液相或气相的界面（如水油界面、水气界面），在界面形成分子层，降低界面能量（界面张力）或表面张力。这种特性使表面活性剂具有及其广泛的应用，包括

乳化、发泡、去污、浸润、分散和增溶等^[10]。许多生物大分子也具有两亲性，能趋向于界面分配，表现出相当高的表面活性和乳化能力，因而把由微生物、植物或动物产生的天然表面活性剂称作生物表面活性剂（Biosurfactants）^[11]。

生物表面活性剂通常比合成表面活性剂化学结构更为复杂和庞大，单个分子占据更大的空间，因而显示出较低的临界胶束浓度^[12]，并且具有选择性好、用量少、无毒，能够被生物完全降解，不对环境造成污染、成本低等优点，具有广阔的应用前景。

2.1 微生物产生的生物表面活性剂

生物表面活性剂具有特定的结构，亲水基团一般是氨基酸或多肽、阴离子或阳离子、寡糖、二糖或多糖。亲脂基团一般是一种或几种脂肪酸的烃链，它可以是饱和的或不饱和的，脂肪酸通过一个糖脂键或酰氨键与亲水基团相连。大多数生物表面活性剂是中性或带负电的，带负电是由于羟基的原因。与结构对应，生物表面活性剂主要可分为^[13,14]：糖脂、脂肪酸和磷脂、含氨基酸类脂（脂肽和脂蛋白）、聚合型生物表面活性剂和特殊型

表 1 微生物产生的生物表面活性剂

Table 1 Many kinds of biosurfactant-producing microorganisms

生物表面活性剂	微生物列举
糖脂	
鼠李糖	铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
海藻糖	红串红球菌 (<i>Rhodococcus erythropolis</i>)
槐糖脂	球拟酵母 (<i>Torulopsis bombicola</i>)
脂肽	地衣芽孢杆菌 (<i>Bacillus licheniformis</i>)
粘液菌素	荧光假单胞菌 (<i>P.fluorescens</i>)
枯草菌肽脂、枯草菌素	枯草芽孢杆菌 (<i>B.subtilis</i>)
短杆菌肽	短芽孢杆菌 (<i>B.brevis</i>)
多粘菌素	多粘芽孢杆菌 (<i>B.polymyxa</i>)
脂肪酸、磷脂	氧化硫硫杆菌 (<i>Thiobacillus thiooxidans</i>)
多聚表面活性剂	乙酸钙不动杆菌 (<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>)

生物表面活性剂，大多数生物表面活性剂为糖脂。有多种微生物可以合成不同类型的生物表面活性剂，但大多数生物表面活性剂是由细菌合成的，有时酵母、真菌也能合成某些表面活性剂。这些微生物之所以能分泌不同类型的表面活性剂是因为它们都可能仅靠烃类为唯一碳源生长，要利用各种烃类就必须使烃类通过外层亲水细胞壁进入细胞，受降解酶作用而被降解，由于烃基水溶性非常小，因此各种微生物常以不同的方式解决这一问题，即分泌不同的表面活性剂。表 1 列出生物表面活性剂的主要种类及其典型的微生物来源。

2.2 生物表面活性剂的应用

生物表面活性剂十分适用于石油污染环境生物修复。不溶性污染物的分散与增溶是生物修复的重要步骤。从土壤中去除有机化合物以及乳化促进微生物同化作用都需要表面活性剂。一些生物表面活性剂可以增强土壤中疏水污染物的生物可利用性和生物降解的作用。例如，已证明铜绿假单胞菌 UG2 生产的鼠李糖具有从不饱和土壤中去除脂肪酸和芳香族污染物的能力^[15]。Vankyke^[16,17]等人研究表明，铜绿假单胞菌合成的鼠李糖脂加入砂土或砂壤土中，烷烃的去除率分别提高 25%—70%和 40%—80%。糖脂类生物表面活性剂不仅可提高烷烃的去除率，而且可加速烷烃的矿化程度，缩短可被微生物利用的适应时间。

也有研究证明：铜绿假单胞菌在土壤中产生的生物表面活性剂，对有毒的有机化合物具有增溶作用，这种生物表面活性剂系统可增加土壤泥浆中六氯酚的溶解度和提取率 31%，为合成表面活性剂的 3 倍以上^[18]。芽孢杆菌产生的一种生物表面活性剂能稳定地乳化杀虫剂硫磷，该生物表面活性剂也能乳化与水不混溶的其它液态有机磷杀虫剂^[19]。洋葱假单胞菌能产生一种生物表面活性剂并能降解不溶于水的除草剂 2, 4, 5-三氯苯氧基乙酸^[20]。这种生物表面活性剂系统也能乳化除氯酚外的除草剂，并能有助于其它有毒化合物的生物降解。

Mulligan 和 Cooper^[21]认为生物表面活性剂能用于泥煤脱水。将生物表面活性剂加到泥煤中能使水在受压下从泥煤中去除。在采矿业和造纸业中，已获得由乙酸钙不动杆菌产生的一种称为生物分散剂的阳离子多糖，其能

稳定矿物的水悬浮液以及避免矿物的絮凝^[22,23]。

总之生物表面活性剂在石油工业、食品工业、化妆品工业及医疗等方面都有很大的应用前景。特别在环境治理方面。

3. 根部定殖的定义、方法和发展以及绿色荧光蛋白标记

3.1 根部定殖的研究

根部定殖 (root colonization) 也有人称为根圈定殖 (rhizosphere colonization)^[24],最先用于描述接种至土豆种块上的促长根圈细菌 (PGPR) 在土豆根部建立种群的能力。其大小 (即定殖密度) 一般采用自根表回收到的引入菌株在植物根部 (既包括根圈, 也包括根表或内根圈) 定居繁殖的主动过程, 而不是简单的引入菌株与植物根被动相遇的过程, 而且, 根部定殖过程是发生在有土生微生物参与竞争的情况下^[25-26]。现在, 一般认为: 根部定殖是指在有土生微生物存在的情况下^[25-29], 接种至种子或植物无性繁殖体部位的微生物在根部繁殖并持续其种群的能力, 与根部定殖概念基本相似的另一个名词是根圈适应性 (rhizosphere competence), 它是指引入的微生物通过种子部位接种后, 在生长根的根圈范围内定殖的能力^[30-38]。

3.1.1 影响根部定殖的主要因素

土壤环境: 土壤质地即影响引入细菌的被动传送, 也影响其根部定殖。研究表明: 细菌在质地较轻 (沙) 的土壤中的运动距离要比在质地较重 (粘) 的土壤中的大, 其根部定殖水平也要高^[39-40]。土壤的含水量对定殖也有很大的影响。据报道, 适合于荧光假单胞菌在根部定殖的合适土壤水基质范围为 -1-140kPa^[25,36,41] 这一变化幅度也许反映了这些菌株在代谢需要方面的差异。或者是他们在不同土壤微生物之间竞争能力的差异^[36]。土壤温度、pH 和土壤的生物学性质都对根部定殖有很大的影响, 很多研究说明来自于土壤微生物的拮抗作用和竞争作用对引入细菌能否在根圈成功定殖有很大的决定作用。

细菌的特性: 现有研究结果表明, 荧光假单胞菌的细胞在根面的附着 (attachment) 能增加其根部定殖。Loper 等^[42]曾发现 8 个假单胞菌菌株在离体条件下的渗透压耐受性与其根圈适应性之间存在很好的相关性。而细

菌的生长速率对其根部定殖也具有重要影响。

植物：根圈微生物主要以根分泌物作为营养源和能源，而根分泌物的质量除受环境因素的影响外，更多的是取决于植物的遗传调控^[43]，因此植物种类^[44]、品种^[43]和生长期^[46]对引入细菌的根部定殖都有重要作用，经遗传转化的烟草，其根部能分泌阿拉伯糖，而假单胞菌属的细菌在这种烟草根圈的适应性强，就在于它能够利用这种糖，所以，通过植物育种方法提高和改善特种微生物在根圈的定殖能力同样具有诱人的前景。

总之，引入细菌的根部定殖及种群动态受多种因素的交互影响。而一个菌株是否有较强的定殖能力还必须通过它在活体条件下的表现才能肯定。因此，揭示细菌在根圈的定殖规律及影响因子的确切作用就必须要用一种全新的活体标记技术。

3.2 绿色荧光蛋白标记

来源于水母的绿色荧光蛋白 (Green Fluorescent Protein, GFP) 基因被作为一种全新的标记基因开始应用^[46-49]，GFP 稳定、灵敏度高，无生物毒性、荧光反应不需要任何外源反应底物及表达无物种或细胞组织的专一性，因此它是一种独特的标记蛋白，因而能方便可靠地用于转基因表达的检测。GFP 为 238 个氨基酸组成的单体，分子量约为 27kD。其野生型 (wtGFP) 的吸收/激发峰在 395nm，在 475nm 有一个次要峰^[50-51]。GFP 已在大肠杆菌、线虫、酵母、果蝇、Hela 细胞、鼠及植物等异源细胞中表达成功，并保存天然荧光活性^[52-54]。

3.2.1 GFP 的生色基团

从多管水母中分离出的 GFP 为单一多肽，它的生色基团 (chromophore) 在各种苛性条件下 (如热、极端 pH、化学变性剂) 都很稳定。比如用酸、碱处理，一旦恢复中性 pH 环境，或是除去变性剂，荧光就可恢复并具有和原来一致的发射光谱^[55-56]。绿色荧光蛋白独特的生物化学性质暗示它含有特殊的结构，它的生色基团是由链内几个被修饰的氨基酸残基经共价键连接而成，被大家所公认的生色集团化学结构见图 1。

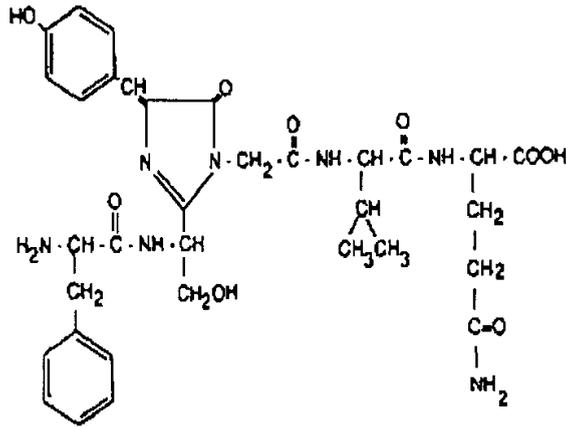


图 1 Aequorea GFP 的生色基团化学结构示意图

Fig 1 Structure of the GFP chromophore and nearly sequence

构成生色基团的 3 个氨基酸: Ser- dehy- droTyr- Gly 位于第 65-67 位, 生色基团由丝氨酸-脱水络氨酸-甘氨酸形成的对羟苯甲基咪唑环酮 (4-P-hydroxybenzylidene-5-imidazolinone) 构成, 其上游第八个氨基酸为色氨酸, 不寻常的是这个色氨酸的荧光检测不到的, 可能是它和生色基团之间的能量转移阻抑了色氨酸荧光 (320nm-350nm), 这个色氨酸附近有多个脯氨酸残基 (Pro-val-Pro-Try-Pro), 它的重要性现在还不明了, 但从蛋白质数据库中找到细胞色素 P-450 蛋白具有这种特性^[57-60]。

3.2.2 GFP 基因的表达

由于 GFP 绿色荧光的产生不需要添加任何基因产物, 生色基团的形成无种属特异性, 因此 GFP 基因可在原核和真核细胞中表达, 并用适当波长的蓝色激发可产生强的绿色荧光。

Chalfie 等将编码 GFP 的 DNA 片段置于 T₇ 启动子的控制下, 成功地在大肠杆菌中表达了 GFP。当用长的紫外光照射时, 发光的细菌很容易地就可在平板上检测出来, 而对照组中却不能看到。GFP 对细菌无任何毒害作用。当将 GFP 从这样的菌株中提纯后, 发现它与纯化的天然 GFP 具有相同的激发和发射光谱。

由于细胞内 GFP 的检测仅需要近紫外或蓝外照射, 而不受底物获得性

的限制，因此，GFP 提供了非常有效的检测基因表达和蛋白质在活细胞中分布位置的方法。它可能作为一种活的标记物，使细胞的生长和运动能在原位被跟踪。特别是这一蛋白质相对小的体积使它在分支的细胞如神经元和神经胶质的胞质内被扩散较为方便。1994 年，Wang 首次成功地使 GFP 在果蝇卵巢中表达^[61]。Davis 等构建了表达融合蛋白的质粒载体，将此质粒导入果蝇，产生了转基因品系。二质粒都可高水平表达，在活的胚胎和幼虫中可看到明亮的绿色荧光^[62]。

3.2.3 GFP 的应用前景

GFP 在原核、真核细胞中的表达展现了其在细胞、发育和分子生物学其他领域研究应用的广阔前景。目前在细菌、酵母、粘菌、植物、果蝇、斑马鱼及哺乳动物细胞中已表达^[63]。因为它能与多种不同蛋白质的 N-端或 C-端融合而保持其天然蛋白质的特性，因此它使一种非常理想的遗传标记物或蛋白质标签。作为活细胞中标记使它具有更广泛的应用，如细胞连接的示踪物、基因表达的报告以及蛋白质与蛋白质之间相互作用的测定物等。同时 GFP 最为转基因动物生产过程中早期阳性胚胎筛选的分子标记已被广泛作用，并用此方法成功地生产了转基因鼠^[64]，这显示着 GFP 在减少转基因胚胎移植的盲目性，提高转基因动物生产效率等方面存在着巨大的潜力。

4. 原生质体的研究进展及电融合技术

原生质体 (protoplast) 一词最初是由 Hanstein 用来表示植物细胞壁内的原生质。1952 年，Salt 用它表示去处细胞壁的植物和微生物细胞的一种特定的结构。1953 年，Weibull 用溶菌酶处理巨大芽孢杆菌得到原生质体。1958 年，Brenner 等提出了原生质体的标准：1) 没有细胞壁 2) 失去细胞刚性，呈球状；3) 对渗透压敏感，脆弱。

原生质体融合起源于 20 世纪 60 年代。1960 年法国的 Barski 研究小组在两种不同类型的动物细胞混合培养中发现了自发融合现象。1962 年 Okada 发现紫外灭活的仙台病毒可以诱导体外培养细胞融合而形成多核体。1974 年，Kao 发现 PEG 在适量 Ca^{2+} 存在下能有效地诱导植物原生质体融合，且大大提高了融合频率，使原生质体融合技术迅速扩展到动物、植物及微生物的各个领域。1979 年匈牙利的 Pesti 首先提出了融合育种提高青霉素产量的报告，从而开创了原生质体融合在实际工作中应用的新局面。

4.1 影响原生质体形成及其再生的因素

进行原生质体融合，首先需要制备原生质体。所以获得有活力、脱壁较完全的原生质体是融合技术的重要步骤之一。虽然微生物原生质体化的基本步骤相似，但在实际操作中，各种不同的微生物甚至不同的菌株其原生质体化的条件不尽相同，有的差异很大。影响原生质体及其融合的主要因素包括：

4.1.1 微生物的生理状态

研究表明，原生质体的制备与再生的最适菌龄一般以对数生长期为宜，这是细胞新陈代谢最为活跃的阶段。若延长培养时间，其原生质体制备率会大大降低，甚至为零。此外细胞的生理状态与其所在的生长环境条件有关。培养基的组成能影响细胞的生长状态和细胞壁的组分，从而直接影响原生质体的形成。因此要根据不同的微生物确定不同的培养条件，尤其是产生菌丝的放线菌和真菌，往往在培养过程中需加入其他化学和物理因素。

4.1.2 酶系的选择

选择什么样的酶制备原生质体主要决定于细胞壁成分。由于不同的微生物其细胞壁结构与组分不同，所实验的酶系也有所差别。革兰氏阴性菌一般用溶菌酶；而革兰氏阳性菌的细胞壁组分除了肽聚糖外，还含有蛋白质、脂质等，其结构紧密，仅用溶菌酶不能完全脱壁，得到的是尚含有一部分外膜的原生质球，因此，需采用 EDTA-溶菌酶，或甘氨酸-EDTA-溶菌酶，或在培养基培养中加青霉素才能获得没有外膜的原生质体。真菌的细胞壁主要由几丁质、纤维素和多糖组成，使用蜗牛消化液和纤维素酶等混合酶解可有效地释放原生质体。

4.1.3 原生质体制备与再生条件

要有效地制备原生质体，除了选择生理状况适宜的细胞和酶系外，还需控制酶解条件，诸如酶的浓度、作用时间、酶解温度以及酶解液的 pH 值等条件。在一定的范围内，随酶浓度和酶解温度的增加，原生质体化加快，其得率增加。但酶浓度和酶解温度超过一定的范围或酶解时间过长，反应速率不再提高，并会导致原生质体活力降低。

影响原生质体再生的因素很多，其中原生质体化时酶解温度影响最大。在一定范围内，虽然随着酶的浓度和酶解温度的增加，原生质体化加快，但原生质体受到的损伤越大，其再生率也随着降低。由于原生质体较细胞对渗透压敏感，因此在制备原生质体的过程中应选择合适的渗透压稳定剂。渗透压稳定剂可分为无机盐类和有机糖类两大类。此外，原生质体的再生能力往往受再生培养基组分的影响，需根据不同的菌株选择合适的再生培养基。获得的原生质体虽然可保存在高渗溶液中，但随时间的延长，原生质体的再生率会明显下降，所以制备的原生质体需及时使用^[73]。

4.2 原生质体融合技术

4.2.1 化学因子诱导融合

最常用的助融剂是聚乙二醇（PEG），它具有促进原生质体融合的作用。PEG 的终浓度为 25-40%。同时加入 50mmol/L Ca^{2+} 或 20mmol/L Mg^{2+} 等阳离子可提高融合率。因为带正电荷的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 与细胞膜表面分子相互作用，有利于原生质体融合率的提高。有时候原生质体融合除了受各种阳离子与其浓度的影响外，还与融合液的 pH 值有关。

4.2.2 电融合

电融合技术是 1980 年以来由 Zimmermann^[65] 等提出，并对几十种植物、微生物原生质体和动物细胞核脂质体广泛地进行电场诱导融合实验，为电融合技术的发展和对其机理的认识奠定了基础。近年来，这种物理融合技术迅速崛起，显示出强大的生命力。其原理是：在短时间强电场（高压脉冲电流，场强为 KV/cm 量级，脉冲宽度为 μs 量级）的作用下。细胞膜发生可逆性电击穿，瞬时地失去其高电阻和低通透性，然后在数分钟内恢复原状。当可逆电击穿发生在两个相邻细胞的接触区时，即可诱导它们的膜相互融合，从而导致细胞融合。

电融合技术的主要优点：（1）融合率高。Zimmermann 等首次用电融合法使燕麦和烟草等原生质体产生融合，其融合率可高达 60% 以上。在普通番茄肉原生质体和多毛番茄原生质体的融合中，分别用 PEG 法和电融合法，结果前者融合率仅为 11%，后者达 57%^[66]；（2）融合迅速、同步且可人为操纵。电融合是通过高强度、瞬间的电脉冲对成串的原生质体击破其相邻

的质膜，被击破的质膜能迅速闭合，融合过程是高度同步的，并在几分钟内完成。而且可在显微镜下直接观察融合室内原生质体的整个融合过程，通过并联一台示波器，对电场进行调节和监控；(3) 毒害小。只要选择合适的电学参数，原生质体融合后仍处于较正常的生理状态。当然，电融合技术也有不足之处，例如电场参数在不同的处理中变化较大，如果处理不当，融合体不易成活，其次，易形成多元融合体，从而影响细胞的进一步分裂。经常出现的现象是融合率和细胞的受损情况成正相关。尽管如此，就目前的许多研究结果和发展趋势表明，电融合法存在一定的优越性^[67]。

5. 课题设计

5.1 根际耦合降解系统的建立

我们把得到的生物表面活性剂产生菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、石油烃类中的多环芳烃萘高效降解菌与从植物根际 (土壤受石油烃污染) 分离得到的优势菌分别进行原生质体电融合，从而得到具有产表面活性剂和对多环芳烃高效降解能力，并均可在根际旺盛生长的两类融合子，再以注射方式将融合子定殖回植物根际土壤。在根际组成产表面活性剂和降解多环芳烃这两类细菌的耦合系统，两类细菌之间的解吸增溶和降解的协同作用使它们在多环芳烃污染土壤中形成相对优势，加上其它的降解作用而构成一个降解污染物，净化土壤的有效系统。

5.2 研究的目的是和意义

修复石油烃污染有很多方法，其中植物修复以其投资省，有良好的生态经济效益而倍受关注^[68-70]。植物修复是植物的吸收和根际微生物降解共同作用的结果。根际是微生物生长的特殊生境，根和微生物之间存在着互惠共生的关系。且根际微生物具有数量大、活性高的特点，对土壤有机质和土壤中 C、N、P 的转化循环有重要的作用，同样在消除污染中也有重要的功能^[71]。根际微生物对石油烃等污染物的降解作用可以清除污染，大大提高土壤的净化能力，形成阻断污染物流向植物根的屏障；植物根对微生物生长的促进作用反过来又提高根际微生物的代谢活性，进而提高净化能力，植物根和根际微生物的这种协同作用是植物生物修复的基础^[72-74]。

植物修复中常用的生物强化方法是把降解微生物加到污染地补充或替

代自然微生物群体，或加入辅基质以促进加入微生物的降解和存活能力，从而促进目标污染物的降解。但这些降解微生物不能很好地适应土壤环境，难与土生的土壤微生物竞争，因此加入微生物的活性逐渐降低，不能充分发挥作用^[75-78]。近年来随着生物技术的发展，生物强化技术的内涵和应用范围不断扩大，可行性和有效性逐渐增强。从总体上说生物强化技术是投加高效的降解微生物。从遗传改造的程度上有经驯化和适应微生物（Genetically modified Microorganisms GMMs）（如诱变处理、转化、转导和原生质体融合得到的高效降解微生物）和基因工程菌（GEMs）。我们设想从提高根际微生物的降解能力入手，通过根际优势菌和高效降葱菌的原生质体电融合得到即能高效降解葱同时在根际土壤中又具有良好活性的融合子。

表面活性剂对石油烃等有机污染物具有解吸和增溶作用，能提高疏水性有机污染物的生物可利用性，提高降解效能，已成功用于污染土壤的生物修复^[79-80]。微生物产生的生物表面活性剂已证明同样具有表面活性剂的增溶、乳化能力，且不会抑制土壤微生物的生长。通过生物表面活性剂产生菌和土壤优势菌的原生质体电融合，得到能在根际稳定存在又能产生生物表面活性剂的融合子。

我们设想把两类融合子重新返回根际土壤，构建成耦合降解系统。弥补以往生物强化中投入的外源降解微生物无法与土生微生物竞争的不足，同时利用产生的生物表面活性剂，增强了降解多环芳烃的效果，提高生物修复的效能，对修复污染环境具有重要的意义。

5.3 研究内容

1. 以铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）为出发菌株，测定其生长曲线，根据其生长周期研究原生质体形成和再生的最佳条件。通过 Co^{60} 辐射诱变得到大量的突变菌株，再通过血平板筛选，排油性能和表面张力的测定，得到 5 株产表面活性剂能力强同时具有多种抗性标记的突变株。

2. 从染料厂废水污泥中分离出两株葱降解菌，对这两株菌进行富集培养，驯化其降解性能并通过紫外诱变得到在葱为唯一碳源平板上生长良好的突变株。同时对突变株进行原生质体制备和再生的研究，确定后期进行电融合的最佳条件。

3. 从 *E.coli* DH5 α F' /pUC-GFP 提取质粒转化根际优势菌 Tu-1 和 Tu-7。根据转化子的荧光特性表明 *E.coli* pUC-GFP 质粒已转入 Tu-1 和 Tu-7, 而且 GFP 基因能在其中表达。对 EGFP 基因进行 PCR 扩增。扩增产物用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切, 而质粒 pTnMod-Ocm 用限制性内切酶 *Hind*III 进行单酶切, 这样在扩增 DNA 片断两端会产生两个粘性末端, 而质粒 pTnMod-Ocm 被切成线型也具有两个粘性末端。再用 Klenow 酶大片段分别进行填平后, 用 T4 连接酶对填平后的质粒 pTnMod-Ocm 和 PCR 扩增产物进行连接。连接产物转化 Tu-1 和 Tu-7 感受态, 在 Tu-1 中得到转化子, 在自然光下就可见到明亮的绿色。

4. 把标记好的生物表面活性剂和蕈高效降解菌分别与带有 GFP 标记的根际优势菌株进行电融合。在交流电场强度 30V/cm; 交流频率 500KHz; 脉冲强度 450V/cm; 脉冲宽度 5 μ s; 脉冲个数为 2 的条件下, 得到融合子 2 株。

第二章 生物表面活性剂产生菌的标记及原生质体制备

1. 引言

生物表面活性剂是由生物体产生的具有表面活性的两性化合物。与化学合成的表面活性剂相比，它们除具有降低表面张力、稳定乳化液和发泡等相同特性外，还具有一般化学合成表面活性剂所不具备的无毒、能生物降解等特性，有利于环境保护。生物表面活性剂已被证明可以增加有机污染物的水溶性，提高生物可利用性，促进土壤中污染物的生物降解^[84-85]。有人提出了生物表面活性剂在石油烃类物质降解过程中的作用模式。认为烃类化合物的憎水性是微生物进行代谢、降解存在的主要问题。由于降解酶位于细胞质膜中，因此，烃基质必须通过外层亲水细胞壁（膜）才能进入细胞内而被酶代谢，某些细菌通过产生生物表面活性剂，具有有利于烃基质被动扩散进入细胞内从而被降解的效应。

大量文献研究证明铜绿假单胞菌^[86]有很强的产生物表面活性剂的能力。我们以一株铜绿假单胞菌作为出发菌株，研究其原生质体的制备和再生条件，并在诱变后进行抗性筛选和产表面活性剂能力的测定。欲与分离的根际优势菌进行原生质体电融合。利用根际优势菌在土壤中良好的竞争性让铜绿假单胞菌产生的表面活性剂更好的发挥乳化、增溶作用且能稳定存在，不易被竞争淘汰。从而进一步促进污染土壤降解多环芳烃的能力，用以修复被污染的环境。

原生质体融合其关键步骤是出发菌株的标记、原生质体的制备、再生及融合。本章研究了根际耦合降解系统构建菌株之一的铜绿假单胞菌的原生质体制备、再生条件。并筛选到具有稳定性状标记的菌株，为下一步的原生质体电融合、产生新的融合子奠定基础。

2. 材料

2.1 实验菌株：铜绿假单胞菌由中国典型培养物保藏中心提供。

2.2 药品:

溶菌酶: 购于华美生物工程公司, 酶活大于 2000u/mg。

氨基酸: 甘氨酸 (Gly), 苏氨酸 (Thr), 赖氨酸 (Lys)。

抗生素: 卡那霉素, 硫酸链霉素, 氯霉素, 红霉素, 核糖霉素, 氨苄青霉素, 青霉素。

2.3 培养基:

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, 水 100ml, pH7.2。

再生培养基: 在完全培养基中添加 0.5mol/l 蔗糖, 0.02mol/l $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 。

基础培养基: 葡萄糖 20g, $(NH_4)_2SO_4$ 10g, KH_2PO_4 1.0g, $MgSO_4$ 0.4g, $FeSO_4$ 0.01g, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.01g, 尿素 2.0g, 生物素 50 μ g, V_{B1} 100 μ g, pH7.0。

血平板培养基: 牛肉膏 0.3g, 蛋白胨 1g, 酵母膏 0.01g, 氯化钠 0.5g, 琼脂 1.8g, 羊血 5g^[87]。

固体培养基另外加 2% 琼脂。各类培养基 (除再生培养基) 均经 121.3 °C (压力 1.05 磅) 蒸汽灭菌 20min 后使用。再生培养基经 115 °C (压力 8 磅) 蒸汽灭菌 30min 后使用。

2.4 试剂:

渗透压稳定剂 (SMM) 蔗糖 0.5mol/l, $MgCl_2$ 0.02mol/l, pH7.5。

溶菌酶溶液: 用稳定剂配成终浓度为 2.0mg/ml 的溶液, 过滤除菌, 置 4 °C 保存备用。

草氨酸结晶紫、美兰、沙黄和复红染液按常规方法配制。

3. 方法

3.1 细胞特性的检测

3.1.1 生长曲线的测定

将菌种接入盛有 5mL 完全培养基的试管中, 置 30 °C、250r/min 震荡培养 12h 后, 按 1% 转入盛有 100mL 培养基的三角瓶中培养, 每隔 1 小时取

样，分光光度计测定 OD₆₀₀ 吸收值。

3.1.2 营养缺陷型的测定

按生长谱法进行。挑取单个菌落，分别对应点种在完全培养基（CM）和基本培养基（MM）平板上 30℃ 培养；将在 MM 上不长而在 CM 生长的菌落分别接种于 CM 和 MM 斜面上复证；再将获得的缺陷型菌株涂布在 MM 上进行初步鉴定和准确鉴定，最后再经补加所缺的营养物质，观测其生长状况而确定营养缺陷型的种类。

3.1.3 抗性测定

将培养物离心洗涤后涂布于 CM 上，采用滤纸片法测定菌株对结构类似物、抗生素的抗性，初步确定后，接斜面复证并多次传代测其稳定性。

3.2 原生质体的制备与再生

将铜绿假单胞菌，自新鲜斜面接一环到 5 mL 完全液体培养基的试管，置 37 ℃ 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 5h 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 ℃, 15 min)，一份样品适当稀释后涂布在完全平板上，计算酶处理前的细胞数，记为 A。

另一份样品的沉淀物用稳定剂洗涤 2 次，弃上清液，加入 6 mL 溶菌酶溶液，置 37 ℃ 水浴保温，隔时取样观察原生质体形成，待原生质体形成率达到 90 % 时终止反应，经 6,000 r/min 离心 10 min，弃上清液，用高渗培养液悬浮沉淀物，适当稀释后分别涂布在完全培养平板上和高渗再生平板上。置 37℃ 培养 48h。前者为酶处理后未脱壁的细胞数（B），后者则为未脱壁的细胞与原生质体再生的细胞总数（C）。

然后再按下列公式计算溶原菌原生质体的形成率和再生率。

$$\text{原生质体的形成率 (\%)} = (A-B) / A \times 100 \%$$

$$\text{原生质体的再生率 (\%)} = (C-B) / (A-B) \times 100 \%$$

3.3 原生质体的观察方法

将溶菌酶处理过的菌液与草氨酸结晶紫稀释染色液在干净的盖玻片上进行混合，再按悬滴法制片，置显微镜下观察并照相^[88]。

3.4 原生质体诱变

将制备好的原生质体悬液和原菌液分别用总剂量为 10 万伦琴的 Co^{60} 辐射 3h, 稀释涂布于完全和高渗平板 37℃ 培养 48h。对长出的单菌落用不同抗生素进行抗性检测和营养缺陷型的筛选。

3.5 产表面活性剂能力的测定

3.5.1 溶血性能的测定

用无菌牙签把筛选出的抗性标记单菌落在血平板上进行点种, 37℃ 培养 1-2d, 利用生物表面活性剂能够溶血的特性^[84], 观察溶血圈直径大小, 直径大小与产生物表面活性剂成正比。

3.5.2 生物表面活性剂排油活性测定

取一培养皿加水, 水面上加 0.1mL 正烷烃形成油膜。把培养的菌液离心除菌, 在油膜中心滴加除菌后的上清, 中心油膜被挤向四周形成一圆圈, 圆圈的直径与表面活性剂含量和活性成正比。圆圈直径大于 3cm 的菌株保留作进一步的研究。

3.5.3 表面张力测定

采用环法测定表面张力, 仪器为 JZHY-180 界面张力仪。

3.6 生物表面活性剂化学分析

薄层层析分析: 取 1ml 发酵液离心, 上清液用氯仿/甲醇 (2/1,v/v) 抽提后进行薄层层析, 展层剂为氯仿/甲醇/水 (65/15/2,v/v/v)。层析后用显色剂显色, 显色剂为: (1) AgNO_3 -丙酮试剂: 0.7g AgNO_3 和 100ml 丙酮, 浸透风干后分别在 5%NaOH, 15% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 液体中漂洗, 糖脂显棕色斑点; (2) 钼氨酸-高氯酸显色剂: 磷脂显色剂^[89]; (3) 茚三酮显色剂: 0.5%无水丙酮溶液, 脂肽显红色。

4. 结果与分析

4.1 菌株的生长曲线

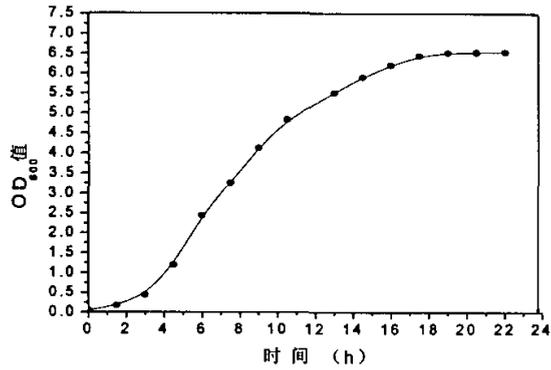


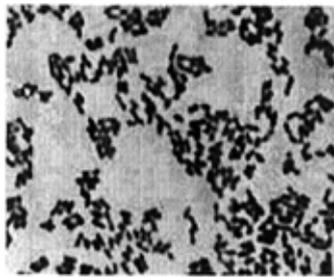
图2 铜绿假单胞菌菌株的生长曲线

Fig 2 The curve of *P.aeruginosa* growth

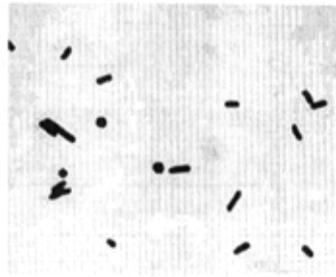
为了确定菌株的生长速率，测定出发菌株铜绿假单胞菌的生长曲线（见图2）。从图2可知，铜绿假单胞菌生长繁殖快，停滞期很短，接入新鲜培养液4h后进入对数生长期，17h后达到稳定期。由此，可以确定菌株处于对数生长期的培养时间，以便制备原生质体时获得培养合适的细胞。

4.2 原生质体形态的显微观察

铜绿假单胞菌用美兰染色为短杆状，而对于不同时间溶菌酶处理的铜绿假单胞菌用稀草酸氨结晶紫染色，形态如图3所示。失去细胞壁的原生质体在表面张力的作用下呈球形。



A



B

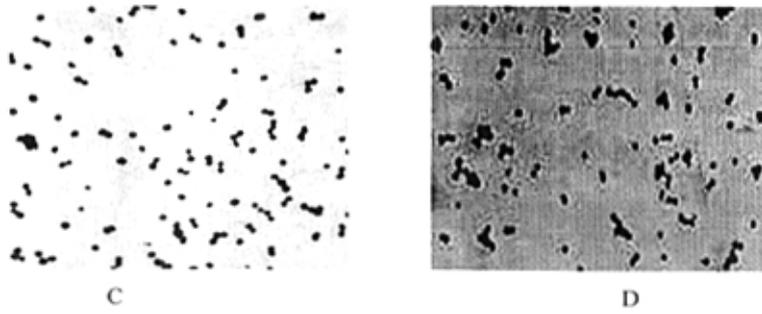


图3 细胞形态及原生质体的显微观察

Fig 3 Configuration of cells and protoplast

A 铜绿假单胞菌细胞个体形态 B 铜绿假单胞菌酶解 0.5h 的原生质体
C, D 酶解之后的铜绿假单胞菌原生质体

4.3 不同生长期的细胞对原生质体形成及再生的影响

在酶浓度为 1mg/ml，酶解时间为 0.5h，处于对数期早、中、晚期的菌体对原生质体形成与再生的情况如表 3。

如表 3 所示，其他条件不改变的情况下，对数期早期的细胞原生质体的形成与再生率高于晚期的细胞。前者原生质体形成率高达 98% 以后，原生质体的再生率则有明显差异。培养到对数期中期的细胞制备的原生质体其再生率只有 23.7%，而培养到晚期的细胞，其原生质体的再生率显著下降，仅为 6.01%。原因是不同生长期的细胞，其细胞结构有所不同，因此对溶菌酶的敏感程度不一样。处于对数生长早期的细胞壁中肽聚糖含量最低，细胞壁对酶的作用最为敏感，在同等条件下原生质体制备率高。由此可见用对数生长早、中期的细胞制备原生质体较适宜。

表 3 菌龄对实验菌株原生质体形成和再生的影响

Fig 3 The effects incubation time on protoplast formation and regeneration

培养时间 (h)	A	B	C	形成率 (%)	再生率 (%)
5	6025	87.9	2910	98.5	47.5
8	3110	64	787	97.9	23.7
14	6171	10014	1310	83.8	6.01

4.4 酶浓度和酶解时间对原生质体的影响

将细胞培养到对数生长中期，酶解时间为 2.5h 分别用终浓度为 1、2、3mg/ml 溶菌酶处理菌体，结果见表 4。在一定范围内酶的浓度越高两种菌株的原生质体制备率就越高，当酶终浓度为 3mg/ml 时其原生质体形成率高达 99.9%。但酶浓度的高低却影响原生质体的再生，此酶浓度下铜绿假单胞菌的再生率低至 0.45%，因为在过高浓度的酶制备原生质体时细胞受损伤较大，失去了重新建成原来细胞所必要的因子。对铜绿假单胞菌而言，用终浓度为 1mg/ml 溶菌酶制备原生质体较好，这时形成率很高同时也具有较高的再生率。

表 4 酶浓度对实验菌株原生质体形成及再生的影响

Fig 4 The effects of concentration of lysozyme on protoplast formation and regeneration

酶浓度 (mg/ml)	A	B	C	形成率 (%)	再生率 (%)
1	3110	22.9	1075	99.3	34.1
2	1650	5.5	53	99.7	2.9
3	880000	1	3960	99.9	0.45

将细胞培养到对数生长期中期，在酶终浓度为 1mg/ml 时，从表 5 可以看出，酶解时间对原生质体形成与再生有明显影响。对铜绿假单胞菌在酶解 0.5-4.5h 范围,消化时间与原生质体形成率成正比，但与再生率成反比。原因是酶解时间越短，细胞壁脱壁越不完全，较易再生出细胞壁，酶解时间越长，脱壁越完全，原生质膜易被酶液破坏，再生较困难。所以考虑到形成率和再生率，两种细菌制备原生质体时酶解时间取 0.5h 较为适宜。

表 5 酶解时间对两种菌株原生质体形成及再生的影响

Fig 5 The effects of treating time on protoplast formation and regeneration

酶解时间 (h)	A	B	C	形成率 (%)	再生率 (%)
0.5	1650	395	640	76.1	19.5
2.5	1650	5.5	53	99.7	2.9
4.5	1650	3.55	19	99.8	0.9

4.5 原始菌株及其原生质体诱变

取铜绿假单胞菌菌液及其原生质体，经 Co^{60} 辐射诱变后分别涂布在完全和再生培养基的平板上，培养后可见大量的菌落形成。从菌落的形态特征来看似乎没有什么明显变化，均为圆球形半透明状。但对不同抗生素的抗性能力表现较强。铜绿假单胞菌菌液诱变得到具有抗性能力的突变株 68 株（如图 4 所示）分别抗青霉素、氨苄青霉素、链霉素、核糖霉素及红霉素。其中青霉素抗性菌株 3 株，记为 $\text{P}_{1-1}-\text{P}_{1-3}$ ；氨苄青霉素抗性菌株 12 株，记为 $\text{P}_{2-5}-\text{P}_{2-17}$ ；链霉素抗性菌株 1 株，记为 P_{3-18} ；核糖霉素抗性菌株 17 株，记为 $\text{P}_{5-19}-\text{P}_{5-35}$ ；其中由菌液诱变后产生的红霉素抗性菌株 34 株，记为 $\text{P}_{7-36}-\text{P}_{7-69}$ ；由铜绿假单胞菌原生质体诱变处理后得到 5 株抗红霉素菌株，记为 $\text{P}_{7-70}-\text{P}_{7-74}$ 。抗性经过几代筛选，挑选性状稳定的突变株斜面保存。同时进行营养缺陷型的筛选得到两株氨基酸缺陷型铜绿假单胞菌菌株，经鉴定为谷氨酸缺陷型。



图 4 A 核糖霉素抗性平板上生长的突变株； B 氨苄青霉素抗性平板上生长的突变株

Fig 4 plate of antibiotics

4.6 标记菌株产表面活性剂能力的测定

将检测具有稳定抗性标记的铜绿假单胞菌突变株进行血平板筛选，发现这些具有抗性的菌株在血平板上均能形成溶血圈，具有溶血性，且溶血圈同原始菌株相比有所增大。可见， Co^{60} 辐射明显地提高产生物表面活性剂的能力。

力。筛选溶血性高的菌株 56 株初步认为具较好的产生物表面活性剂能力,进一步地进行排油活性、表面张力的测定,结果如表 6。

表 6 诱变菌株产生生物表面活性剂能力的测定

Table 6 Determine the capability of biosurfactant-producing mutants

菌株号	排油圈直径 cm	表面张力 (mN/M)	菌株号	排油圈直径 cm	表明张力 (mN/M)
P ₁₋₁	5.0	42.1	P ₅₋₃₁	4.2	43.4
P ₁₋₂	3.6	41.6	P ₅₋₃₂	5.6	40.5
P ₂₋₅	4.5	41.3	P ₅₋₃₃	9.5	40.1
P ₂₋₆	3.4	43.1	P ₅₋₃₄	>12	34.6
P ₂₋₇	7.5	39.4	P ₅₋₃₅	4.0	42.0
P ₂₋₈	5.5	46.2	P ₇₋₃₆	<3	未测
P ₂₋₉	5.1	43.4	P ₇₋₃₇	4.5	43.1
P ₂₋₁₀	5.5	40.6	P ₇₋₃₈	5.5	40.8
P ₂₋₁₁	4.0	44.2	P ₇₋₃₉	7.2	40.6
P ₂₋₁₂	6.3	39.7	P ₇₋₄₀	6.5	41.3
P ₂₋₁₃	8.4	38.1	P ₇₋₄₁	3.6	46.2
P ₂₋₁₄	7.1	40.3	P ₇₋₄₂	5.4	41.9
P ₂₋₁₅	5.4	41.8	P ₇₋₄₄	7.3	39.7
P ₂₋₁₆	4.3	42.2	P ₇₋₄₅	4.6	43.2
P ₂₋₁₇	<3	未测	P ₇₋₄₈	4.6	44.3
P ₃₋₁₈	4.4	43.5	P ₇₋₄₉	<3	未测
P ₅₋₁₉	5.2	41.6	P ₇₋₅₀	>12	34.5
P ₅₋₂₀	<3	未测	P ₇₋₅₁	6.8	40.1
P ₅₋₂₁	6.7	39.6	P ₇₋₅₂	6.2	40.2
P ₅₋₂₂	5.5	40.1	P ₇₋₅₃	5.1	43.3
P ₅₋₂₃	>12	34.8	P ₇₋₅₇	5.4	43.6
P ₅₋₂₄	>12	36.2	P ₇₋₆₃	<3	未测
P ₅₋₂₅	6.3	39.3	P ₇₋₆₅	6.7	39.4
P ₅₋₂₆	3.5	44.6	P ₇₋₆₉	8.3	38.9
P ₅₋₂₇	<3	未测	P ₇₋₇₀	9.7	37.4
P ₅₋₂₈	6.0	41.3	P ₇₋₇₁	6.8	40.2
P ₅₋₂₉	7.1	40.1	P ₇₋₇₃	5.6	41.3
P ₅₋₃₀	5.1	42.3	P ₇₋₇₄	>12	35.2

由表 6 可知突变株 P₅₋₂₃、P₅₋₂₄、P₅₋₃₄、P₇₋₅₀、P₇₋₇₄ 的排油圈直径大于 12cm，表面张力降到最低。并经多次传代培养性状稳定。此外 P₂₋₇、P₅₋₂₅ 及 P₇₋₆₉ 等都具有较好的产生物表面活性剂的能力。

从测定菌株中选择产生物表面活性剂能力最强的 5 个菌株在多种抗生素平板上测其抗性特性，结果如表 7。P₅₋₂₃ 可抗卡那霉素、氨苄青霉素、新霉素、红霉素 4 种抗生素，P₅₋₂₄ 菌株对氯霉素、氨苄青霉素、卡那霉素、红霉素等抗生素具有抗性能力。P₇₋₇₄ 抗性与 P₅₋₂₄ 同，P₅₋₃₄ 和 P₇₋₅₀ 也分别有不同的抗性其中抗红霉素为这几种突变株共同具有的抗性。这些抗性特性可作为融合的选择标记。

表 7 突变菌株抗性（单位为 μ /mL）的测定

Table 7 Determine the capability of resisting the antibiotics of mutants

突变株	卡那霉素 100	氯霉素 30	氨苄青霉素 100	新霉素 50	链霉素 100	红霉素 50	四环素 50
出发菌株	-	-	+	-	-	+	-
P ₅₋₂₃	+	-	+	+	-	+	-
P ₅₋₂₄	+	+	+	-	-	+	-
P ₅₋₃₄	+	-	+	-	-	+	-
P ₇₋₅₀	-	+	-	-	+	+	-
P ₇₋₇₄	+	+	+	-	-	+	-

4.7 生物表面活性剂化学结构分析

由于糖脂带有醛基，与显色剂发生氧化还原反应会出现棕色，通过薄层层析，在显色剂作用下，上述的 5 株突变菌株在硅胶板上均出现棕色斑点。因此证明产生的表面活性剂为糖脂。

5 小结

铜绿假单胞菌原生质体形成与再生条件的研究表明：对数生长期前期的细胞在浓度为 1mg/ml 溶菌酶的作用下，酶解时间在 0.5h 时原生质体的形成率和再生率均较高。当其他条件一定，培养时间越长的原生质体形成率

和再生率越低；而酶的浓度和酶解时间的增加有利于原生质体的形成，但其再生能力受到影响，所以制备铜绿假单胞菌原生质体时应考虑形成率和再生率两方面原因。同时在整个制备原生质体的过程中，洗涤和稀释都不能剧烈振荡，否则会大量破坏原生质体。

通过 10 万伦琴 Co^{60} 辐射诱变，得到 73 株带抗性的突变株，其中 P₅₋₂₄ 和 P₅₋₃₄ 等具有多种抗性且性状稳定，同时还得到由原生质体辐射诱变产生的营养缺陷型突变菌株 2 株，为下一步电融合找到良好的遗传标记。

通过突变株的溶血性、排油性、表面张力的测定初步筛选出产生生物表面活性剂能力强的菌株，并通过薄层层析分析证明突变菌株产生的生物表面活性剂为糖脂，要进一步分析糖脂类型可借助于其它分析仪器。

第三章 降萘细菌的分离纯化及原生质体制备

1. 引言

多环芳烃是广泛分布于环境中含有两个和两个以上的有机化合物。具有结构稳定，难生物降解的性质，且大多有致癌，致畸和致突变特性。多环芳烃是石油，煤，木材等含碳氢化合物的物质在不完全燃烧过程中产生的，其中多种为一级污染物。

萘含有三个苯环，是典型的多环芳烃结构，被国际上列为优先控制的有毒有机化合物。为单斜片状晶体，具有紫色荧光，分子量：178，其比重为 1.25，沸点为 342℃，熔点为 218℃，是煤焦油中的一个重要组分。不溶于水，微溶于乙醚，溶于乙醇，苯，氯仿，二硫化碳，四氯化碳及甲苯等。萘作为多环芳烃的代表化合物之一，具有强的致癌、致畸和致突变的效应，它引起小鼠产生肿瘤反应的最低剂量为 3300mg/kg^[90]，也有文献报道萘为不活泼的致癌剂^[91]。它是美国环保局公布的 129 种优先污染物中的一种，在许多自然环境中都能检出，主要来源于固体燃料加工工业及树脂、化学、染料生产的排放废物。已有研究表明，萘具有一定程度的生物降解性。

在研究微生物对多环芳烃的生物降解中，萘常作为模式化合物使用。在以往的研究中多集中在白腐真菌对萘的降解作用上：1989 年 Bumpus 等首次以萘油为底物进行试验，发现在萘油质量浓度为 50mg/L 的萘油水溶液中培养 30d 后，白腐真菌将原每 g 萘油中所含的 0.32g 萘降至 0.0064g^[92]。后来 Hammel 等人则揭示了萘在白腐真菌降解酶系统作用下的降解途径：萘先转变为 9,10-萘醌，最终变为邻苯二甲酸和 CO₂^[93]。

本实验主要从含有萘的染料厂废水中分离筛选出相对优先降解萘的降解性菌株，并通过富集培养，紫外诱变育种对其降解性能进行驯化。同时对分离出的萘降解菌株进行原生质体制备，再生的研究。

2. 材料

2.1 土样来源

含有萘等多环芳烃有机污染物的染料污泥（武汉染料厂）

石油污染的土壤（武汉石油化工厂）

2.2 培养基和培养方法

基础培养基: NH_4Cl 1.0g, MgSO_4 0.064g, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.6g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 8g, H_2O 1000ml, pH 7.0。

葱为唯一碳源的培养基: 在上述基础培养基上加入不同量的溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 的葱溶液 (每 75 μL DMF 含 1mg 葱)。

富集培养基: 葱的浓度不断递增从 10—100mg/L, 而蔗糖的浓度不断递减从 10—0.1g/L, 其他成分同基本培养基。

牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏 0.5g, 蛋白胨 1.0g, NaCl 0.5g, 水 100ml pH 7.0。

完全培养基: 蛋白胨 10g, 酵母粉 5g, NaCl 10g, 水 1000ml, pH 7.2, 加入溶于 N,N-二甲基甲酰胺的葱 100mg, pH 7.2。

再生培养基: 在完全培养基中添加 0.5mol/l 蔗糖, 0.02mol/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 。

固体培养基另外加 2% 琼脂。各类培养基 (除再生培养基) 均经 121.3 $^{\circ}\text{C}$ (压力 1.05 磅) 蒸汽灭菌 20min 后使用。再生培养基经 115 $^{\circ}\text{C}$ (压力 8 磅) 蒸汽灭菌 30min 后使用。

3. 方法

3.1 葱降解细菌的分离纯化

富集培养: 两种土样分别取 10g 于已灭菌的装有玻璃珠的 99ml 生理盐水的 250ml 锥形瓶中, 摇动 15min 后, 静置, 使土样中细胞均匀分散, 分别取 1ml 上清液接种于已无菌的装有 100ml 牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 1-2d, 使菌体大量增殖。

将 1ml 上述培养液接种于梯度富集培养基的 250ml 锥形瓶中 (每份土样做五个重复组), 置 28 $^{\circ}\text{C}$, 100rpm 富集培养, 根据混浊度观察菌体繁殖。通过这种间歇式定时、定量逐步提高碳源浓度的方法, 以葱为唯一碳源驯化长期被染料废水污染的污泥。

分离纯化: 将富集培养后的菌液分别系列稀释, 取稀释度为 10^{-4} 、 10^{-5}

⁵、 10^{-6} 的菌液各取 0.2ml 涂布于以葱为唯一碳源的固体平板上，于 28℃ 恒温培养两天后，挑取平板上形成的不同形态的单菌落，分别接种于葱为唯一碳源斜面培养基保存。如此重复多次，选择生长良好的菌落作为紫外诱变的出发菌株。

3.2 紫外诱变育种

致死曲线的确定：将分离纯化的降葱菌株用葱为唯一碳源的培养基斜面于 30℃ 活化 2 天后，每支斜面用 8ml 生理盐水洗下菌苔，于 3500rpm 离心 10min，菌体用生理盐水制成菌悬液后倒入无菌三角瓶中（内有 10 颗无菌玻璃珠），振荡 30min 使菌体分散，分别吸取 30ml 菌悬液于 6 个 6cm 无菌平皿（内放一无菌搅拌棒）中。将平皿置于磁力搅拌器上，在 15W 紫外灯（先预热 20min）下 30cm 处照射 1min 后，打开平皿盖分别搅拌照射 0.5、1、1.5、2、2.5、3min，以不照射为对照。诱变处理完后在红灯下将各组和对照组分别稀释成 10^{-1} — 10^{-6} ，取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、三个稀释度涂平板，每个稀释度涂平板 3 只，每只平板加稀释菌液 0.1ml，并用无菌扩棒涂匀。除对照组外，均用黑纸包好，于 30℃ 培养两天后计数，计算每毫升菌液的活菌数，并计算紫外诱变后的存活率和致死率：

$$\text{存活率}(\%) = \text{处理后每毫升活菌数} / \text{对照每毫升活菌数} \times 100$$

$$\text{致死率}(\%) = (\text{对照每毫升活菌数} - \text{处理后每毫升活菌数}) / \text{对照每毫升活菌数} \times 100$$

紫外诱变处理：将菌株斜面活化后，依上述方法处理，照射时间为约 90% 的致死率的处理时间，适当稀释涂布于葱为唯一碳源的培养基上，于 30℃ 恒温培养两天后，挑取平板上生长的单菌落，分别接种于葱培养基斜面保存。将挑选出的菌落用葱培养基斜面转接几次用以检测其性状的稳定性。

3.3 分离菌株生长曲线的测定和形态观察

生长曲线的测定同第二章，培养基为含 100mg/L 葱的完全培养基。将菌液进行美兰染色，置显微镜下进行形态观察并照相。

3.4 葱浓度的测定

制备葱的标准曲线：精确配置一系列的葱标准溶液，在 $\lambda = 254\text{nm}$ 处进行紫外测定，以葱含量对吸光度绘制标准曲线。

将分离出的降葱菌株，自新鲜斜面取一环接入试管装的液体完全培养基中， 28°C 振荡培养 15h。分别取 2.5ml 菌液接入装有 250ml 含 100mg/L 葱完全培养基的 500ml 三角瓶中， 28°C 振荡培养 10h。取上述菌液 25ml，用环己烷萃取，萃取液用硅胶薄层色谱板分离，以葱的标准溶液作参照，石油醚作展开剂，以碘蒸汽作显色剂。刮下色谱板上葱样点，用石油醚融解，用紫外分光光度计，测其葱吸光度，然后查找标准曲线，从而得知培养基中特定时刻的葱浓度。测葱吸光度时，工作波长为 254nm ^[94]。

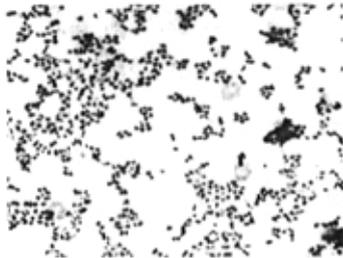
3.5 原生质体的制备与再生

方法同铜绿假单胞菌原生质体的制备与再生。

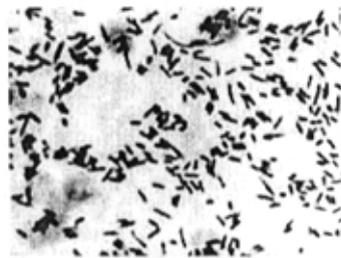
4. 结果与分析

4.1 葱降解菌的分离与形态观察

对武汉染料废水沟内土壤样品中能降解葱的细菌，经过 7 种葱浓度一次递增的富集培养基进行驯化，富集，得到驯化状况良好，且富集程度较高的菌液。用以葱为唯一碳源的平板上进行分离，得到两个菌株，分别记为 AN-1 和 AN-2。其中 AN-1 菌落呈圆形、淡褐色、光滑、菌体呈圆形，而 AN-2 菌落为不规则型、深褐色、有皱褶、菌体呈杆状，形态如图 5 所示。



A AN-1 的菌体形态



B AN-2 的菌体形态

图 5 葱降解菌的显微观察

Fig 5 The configuration of AN-1 and AN-2

4.2 葱降解菌诱变

从土样中获得 2 种菌落形态不同的菌株；并以这 2 种菌株作为出发菌株，进行紫外诱变。把 AN-1、AN-2 菌株分别进行 1min, 2min, 3min 紫外照射，标号分别为 1#, 2#, 3#。(对照的菌液用 0# 表示)。致死率分别为 15%, 30%, 32%。从生长的状况来看照 3min 后的细菌生长速度最快，菌落直径越大。把 3# 照同样方法进行第二次诱变，照射剂量为 1min, 2min, 3min 的菌体标号分别用 1#', 2#', 3#' 表示，测定其致死率分别为 75%, 78% 和 100%。诱变后的菌种，以菌落大小，生长快慢作为菌利用葱能力强弱的标志，从而确定其降解能力的高低。

以 AN-2 为例(见图 6)，AN-2 菌落的 3# 菌体在紫外照射后全部死亡，致死率高达 100%。除 3# 外对照 0# 为自然生长，速度缓慢，诱变后存活的细菌生长好于诱变前，具有较好的降解葱的能力。就其菌落生长状况比较，两次诱变发现随着诱变剂量的增加，存活菌落大小和生长速度也增加，但同时致死率也相应增加。在第二次诱变的 1#' 和 2#' 菌比较，发现 1#' 培养的前 3d 比 2#' 生长状态好，但培养超过 3d 后，2#' 反而好于 1#'。而 AN-1 菌落的诱变情况类似于 AN-2，也是随诱变剂量的增加，菌落大小和致死率相应递增。两种菌株都选择二次诱变之后的 1#' 为后期研究的出发菌株，分别标号为 AN-1' 和 AN-2'。

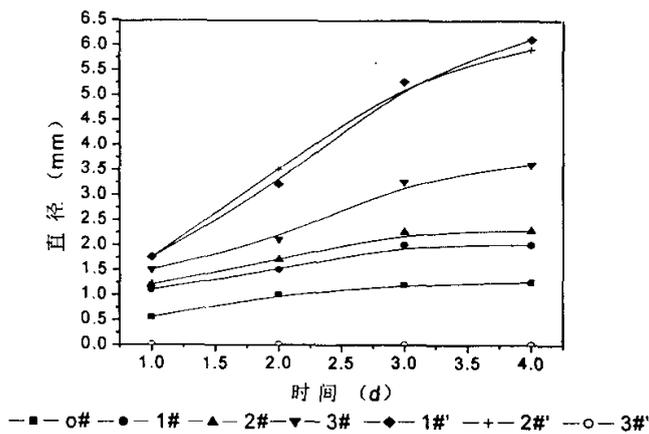


图 6 葱降解菌的紫外诱变

Fig 6 UV-induction of AN-2

4.3 突变菌株对葱降解效果的测定

将诱变得到的菌株 28℃ 恒温振荡培养，分别于培养的第 16、32、56、80、100h 测定葱的含量。葱初始浓度为 100mg/L。葱浓度随着培养时间变化趋势如图 7。结果表明 AN-1' 和 AN-2' 降解葱时，前 16h 内降解转化速度较快，葱的浓度从 100mg/L 分别降至 25.6mg/L 和 35.8mg/L，AN-1' 的降解速率略高于 AN-2'。但随着反应时间的延长，两者的降解速度均开始减慢。当反应进行到 60h 时，AN-2' 的降解效率超过 AN-1'。当培养时间到达 100h 时

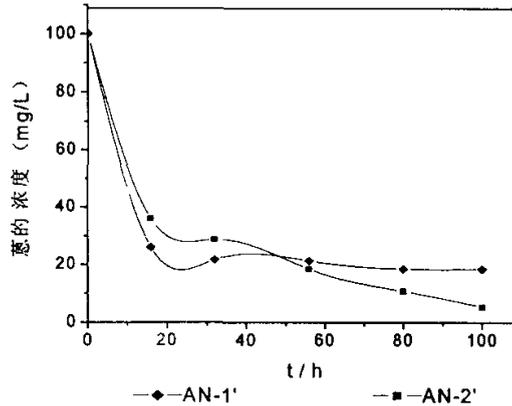


图 7 AN-1'、AN-2'对葱的降解结果

Fig 7 Degradation rate of AN-1' and AN-2'

时，AN-2'培养液中葱的浓度降低到 3.2mg/L。这两种葱降解菌尽管其降解变化速度各不同，但都呈快速降解再趋于平缓的变化趋势。影响降解速率保持较高水平的主要有几个因素：(1)随着培养时间的延长，培养液中营养物质的浓度的降低，降解菌的生长速率降低。(2)溶解氧的减少。因为烃的降解是一个氧化过程，溶解氧的浓度会直接影响烃的氧化。根据葱的最终降解效果把 AN-2'作为下一步电融合的出发菌株，进行了下面的原生质体制备和再生条件的研究。

4.4 菌株的生长曲线

对降解系统的构建菌株 AN-2'的生长曲线进行了测定如图 8，由图 8 可知出发菌株 AN-2'接入新鲜培养基培养 0-4h 为停滞期，停滞期时间很

短，接着进入对数生长期从 5—21h，之后进入生长平台期。分别取培养时间的 6h—8h 的对数生长早期细胞进行原生质体的制备、再生研究。

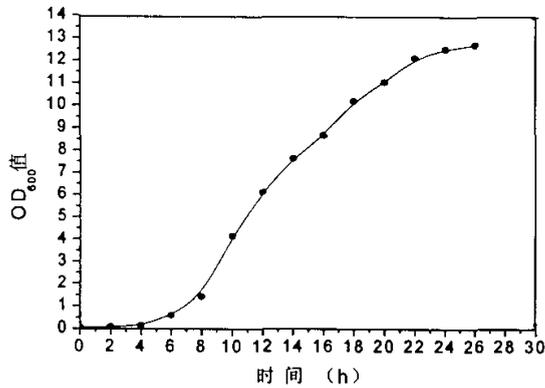


图 8 AN-2'菌株的生长曲线

Fig 8 The curve of AN-2' growth

4.5 蕈降解菌的原生质体制备条件

取对数生长前期的 AN-2'在酶解时间为 0.5h 下，在溶菌酶的终浓度分别为 1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml 条件下分别测其形成率和再生率如表 8。由表 8 可见，随着溶菌酶浓度的增加，AN-2'原生质体的形成率也在增加，当溶菌酶终浓度为 3mg/ml 时形成率为 99%，但同时原生质体再生率也降低到 1.25%。但当溶菌酶终浓度为 1mg/ml 时原生质体的形成率较低。不利于电融合。所以制备 AN-2'菌株的原生质体时取溶菌酶终浓度为 2mg/ml，这时原生质体的形成率和再生率均较好。

表 8 酶浓度对原生质体形成及再生的影响

Fig 4 The effects of concentration of lysozyme on protoplast formation and regeneration

酶浓度 (mg/ml)	A	B	C	形成率 (%)	再生率 (%)
1	2540	1132	1684	55.4	39.2
2	2370	423	854	82.2	22.1
3	1420	2	15.7	99.9	1.0

短，接着进入对数生长期从 5—21h，之后进入生长平台期。分别取培养时间的 6h—8h 的对数生长早期细胞进行原生质体的制备、再生研究。

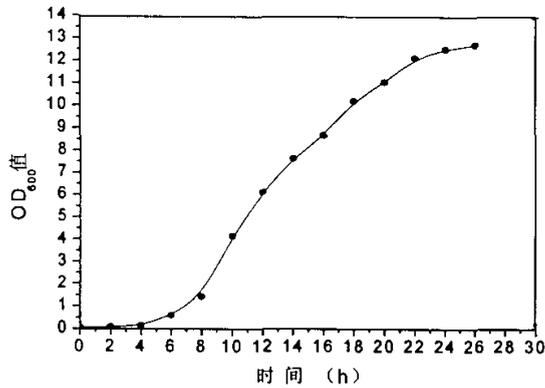


图 8 AN-2'菌株的生长曲线

Fig 8 The curve of AN-2' growth

4.5 蕈降解菌的原生质体制备条件

取对数生长前期的 AN-2'在酶解时间为 0.5h 下，在溶菌酶的终浓度分别为 1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml 条件下分别测其形成率和再生率如表 8。由表 8 可见，随着溶菌酶浓度的增加，AN-2'原生质体的形成率也在增加，当溶菌酶终浓度为 3mg/ml 时形成率为 99%，但同时原生质体再生率也降低到 1.25%。但当溶菌酶终浓度为 1mg/ml 时原生质体的形成率较低。不利于电融合。所以制备 AN-2'菌株的原生质体时取溶菌酶终浓度为 2mg/ml，这时原生质体的形成率和再生率均较好。

表 8 酶浓度对原生质体形成及再生的影响

Fig 4 The effects of concentration of lysozyme on protoplast formation and regeneration

酶浓度 (mg/ml)	A	B	C	形成率 (%)	再生率 (%)
1	2540	1132	1684	55.4	39.2
2	2370	423	854	82.2	22.1
3	1420	2	15.7	99.9	1.0

取对数生长前期的 AN-2'，在溶菌酶的终浓度为 2mg/ml 条件下，酶解时间分别为 0.5h、2.5h、4.5h 条件下分别测其形成率和再生率如表 9。

表 9 酶解时间对原生质体形成及再生的影响

Fig 5 The effects of treating time on protoplast formation and regeneration

酶解时间 (h)	A	B	C	形成率 (%)	再生率 (%)
0.5	2370	423	854	82.2	22.1
2.5	2370	12.5	68	99.4	2.4
4.5	2370	4.2	16	99.8	0.4

由表 9 可见，当酶解时间超过 2.5h 之后 AN-2' 菌株的原生质体形成率达到很高，接近于 100%，但再生率非常低。制备原生质体利于电融合和融合子再生的酶解时间最好小于 1h。

5. 小结

本实验以从含蒽等多环芳烃的染料废水厂污泥中分离纯化出两株降解蒽的细菌，并对这两种菌株进行紫外诱变，根据诱变菌株在以蒽为唯一碳源上的生长状况进行筛选。在蒽浓度为 100mg/ml 培养条件下优先降解蒽的降解菌株 AN-2'，在培养 4 天后，降解了 90% 以上的蒽，且在培养后期，蒽的降解速率较快。以 AN-2' 为出发菌株，进行原生质体的研究。

根据测定的 AN-2' 的生长曲线取其培养到对数生长早期的菌液，研究原生质体生成的最佳条件：在溶菌酶终浓度为 2mg/ml。酶解时间 0.5h 的原生质体的形成率可达 82.2%，而再生率为 22.1%，与生物表面活性剂产生菌相比酶解时间的增加有利于其原生质体的形成，同时提高溶菌酶的终浓度也有利于原生质体的形成，但则降低了原生质体再生率。因此选择溶菌酶终浓度为 2mg/ml，酶解时间为 0.5h 制备的原生质体进行后期的电融合。

第四章 根际土生优势菌的分离与绿色 荧光蛋白标记

1. 引言

生物修复一直以来是处理污染土壤环境的重要方法，而在生物修复中各种降解有机污染物的微生物起着至关重要的作用。长久以来，生物修复的研究着重于宏观生物量的投入于降解率之间的关系，对微观的微生物如何在污染环境植被根部发生作用，如何与根际微生物竞争，与协同研究较少。其主要原因一方面是影响生物修复因素的复杂性，另一重要原因也是由于缺少有效的标记。同时生物强化中投加的外源微生物面临的是一个复杂的生态系统，不管何种强化方式，外源微生物都要克服新环境的压迫条件，与土生微生物竞争营养和生成空间。因此一般来说投加的外源微生物的数量会减少。活性会降低，不能充分发挥生物强化的作用，解决这个问题的途径主要是使投加的外源微生物具有更强大的降解能力，更持久的存活能力。我们设想通过原生质体电融合的方法，利用土生优势菌在根际的生长优势提高生物强化中外源微生物的存活率，从而提高其降解性能。

八十年代以来，在土壤微生物学的研究领域内，关于植物根部定殖已经成为热点。但是构建细菌在植物根部的定殖与活动规律受到很多因素的影响，有非生物因素（如水势、温度、pH 值）和生物因素（宿主细胞、细菌本身特性等）^[95]。由于传统的研究方法难以将引入的菌株与同类土生微生物分开，以致研究结果准确性不高。

随着分子生物学技术的发展，跟踪释放到自然环境中的微生物和遗传物质的效果也大大提高。免疫学方法、核酸探针技术虽然能准确检测释放到环境中的特殊微生物群，但不能区别死、活细胞、且费时费力。外源分子标记技术则克服了这些缺点，标记基因种类很多，其中绿色荧光蛋白基因越来越受到重视，它编码的 238 个氨基酸组成的 GFP 是一种对光稳定的可溶性蛋白，在长波紫外光和蓝光激发下就能发出绿色荧光，而不需添加任何酶或底物，因而检测十分方便快捷，无背景干扰，同时 GFP 也是在异

源细胞内表达后自发产生荧光的蛋白质。

除了野生型 GFP，克隆技术又产生了三种遗传突变体：EGFP（Enhance GFP）^[96]，GFP-S65T^[97]和 RSGFP（Red-shifted GFP）^[98]。这些突变体有两个主要的优点，（1）它们的荧光信号的强度明显要比野生型的强；（2）它们具有红外转换激光光谱（red-shifted excitation spectra）。其中 EGFP 有两个氨基酸已替换，即 Phe-64→Leu 和 Ser-65→Thr。根据等量可溶性蛋白光谱分析，EGFP 的荧光强度比野生型的大 4—6 倍。EGFP 基因编码区长 717bp，编码产物增强型绿色荧光蛋白含 239 个氨基酸残基。EGFP 最大激发波长由原来 GFP 的 390nm 增加到 480nm 左右。这样不仅有利于荧光显微镜观测和流式细胞仪检测，且在自然光下也可见到绿色荧光，更便于检测。

2. 材料

2.1 菌株和质粒

携带质粒 pGFP 的 *E.coli*: DH5a/pGFP, 由中国典型培养物保藏中心提供。

携带质粒 pEGFP 的 *E.coli*: TG1/pEGFP, 由中国典型培养物保藏中心提供。

Escherichia coli JM109/pTnMod-Ocm, Cm^r, 由中国典型培养物保藏中心提供。

2.2 黄麻品种

黄麻 (*Corchorus. Capsulari*) 购于广西

2.3 培养基

KB 培养基：黄麻根际土壤浸出液，2%琼脂 100Pa 灭菌 20min。

LB 培养基：蛋白胨 10g，酵母粉 5g，NaCl 10g，水 1000ml，pH 7.2。

铜绿假单胞菌和葱降解菌株培养基同前。

2.4 试剂

溶液 I：50mmol/L 葡萄糖，25mmol/Tris-HCl (pH8.0)，10 mmol/LEDTA (pH8.0)。

溶液II：0.2mol/LNaOH，1%SDS。

溶液III：5mol/L 乙酸钾 60mL，冰乙酸 11.5mL，蒸馏水 28.5mL。

溶液IV：饱和酚：氯仿：异戊醇（25：24：1）。

TE 缓冲液：10mmol/Tris-HCl（pH8.0），1 mmol/LEDTA（pH8.0）。

TAE 电泳缓冲液：40 mmol/Tris-HCl（pH8.0），40mmol/LHAc，2mmol/LEDTA（pH8.0）。

溴酚蓝上样缓冲液：0.25%溴酚蓝，40%蔗糖。

T₄DNA 连接酶、限制性内切酶：购自宝生物工程（大连）有限公司。

TaqDNA 聚合酶、溶菌酶、RNaseA 和 dNTP：购自华美生物工程公司。

PCR 引物：增强绿色荧光蛋白基因（EGFP）

上游引物：5'-GGGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGG-3'

下游引物：5'-GCAAAGCTTCTTGTACAGCTCGTCCCGG-3'

上海亚博生物技术有限公司合成。产品经 PAGE 纯化，纯度大于 99%。

2.5 主要仪器

冷冻高速离心机：美国 Beckman 公司生产。

PCR 仪。

荧光显微镜。

3. 方法

3.1 黄麻人工体系的构建

取土样打散，加水拌匀，装入种植箱内。种植箱容积 100×100×110（cm³），底部设 10×10cm 的排水沟，箱内供试土壤为 1m³。黄麻种子用甲醛溶液浸泡 5min 除去毒素后蒸馏水浸泡过夜直到发芽，分散放到放了滤纸的培养皿里，27℃培养箱培养同时浇无菌水保湿到长出幼苗，再播种。每箱播入 20 粒出芽黄麻种子。自然光照培养，定期浇水和营养液。

3.2 人工模拟污染土壤

将石油先与少量土壤混匀，再拌入种植箱上层（0-50cm）土壤中，构成人工污染土壤环境，平衡培养 2 个月待黄麻生长至半米高后分离根际优

势菌株。土壤石油浓度设 4 个水平，分别为 20、40、80、120ml/kg。

3.3 根际优势菌株的分离

轻轻拔出麻苗，抖掉根上松散的附着土。将麻苗自根茎处剪断，称取根 1g，用无菌水漂洗 3 次后，将根置于盛有 10mL 无菌水的试管中，剧烈振荡 3—5min 即成根际土壤悬浮液，按梯度稀释后，选择适当的稀释度分别在 KB 培养基上涂平板（每一梯度 3—5 皿），再置于 28℃ 培养。24h 后挑取不同类型的单个菌落，在 KB 平板连续纯化，从而得到纯培养，4℃ 保存于 KB 斜面待用。并根据不同菌落稀释涂布平板上的总数确定其黄麻根际生长的优势。

3.4 生长曲线的测定

将菌种接入盛有 5mL LB 培养基的试管中，置 30℃、250r/min 震荡培养 12h 后，按 1% 转入盛有 100mL LB 培养基的三角瓶中培养，每隔 1 小时取样，分光光度计测定 OD₆₀₀ 吸收值。

3.5 EGFP 基因的克隆与表达

2.5.1 质粒 DNA 的小量制备

从斜面上挑取菌苔接种于 5mL 含 Ap (100 μg/ml) 的 LB 培养基中，37℃ 振荡培养 12—16h，以 2% 的比例转入含 Ap 的新鲜 LB 培养液中，37℃ 继续培养 8h。取适量培养物于 1.5mL Eppendorf 管中，10,000g 离心 10s，加入 300 μL 冷的溶液 I 中，振荡 5—10s，加 200 μL 新配的溶液 II，混匀后冰浴 3min，再加入 150 μL 溶液 III，可见絮状沉淀。经 14,000g 离心 5—10min，将上清液转至另一 Eppendorf 管中，加入溶液 IV，14,000g 离心 5—10min，再将上清液转至另一 Eppendorf 管中，加入 2 倍体积的冰无水乙醇，混匀后静置 10—20min。再经 10,000g，离心 2min，弃上清，用 70% 乙醇淋洗两次，待干后加入 30 μL TE 缓冲液至完全溶解。取 10—20 μL 进行琼脂糖凝胶电泳。

2.5.2 EGFP 基因的 PCR 扩增

以制备含 EGFP 基因的质粒 DNA 为模板，利用合成引物进行 EGFP 基

因的 PCR 扩增。扩增条件：变性温度：94℃，60s；复性温度：55℃，60s；延伸温度：72℃，90s；循环次数共 35 次，最后一个循环 72℃延伸 10min。

2.5.3 重组质粒的构建

将 PCR 扩增产物用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind*III 酶解。反应条件：10×缓冲液 E 2 μ L，乙酰化 BSA (1mg/mL) 2 μ L，DNA 底物 2 μ g，限制性内切酶 2–4u，补充三蒸水至 20 μ L。混合后将反应管置 37℃水浴保温 1h。

将提取的含 Tn5 转座子的 pTnMod-Ocm 质粒去 RNA 酶纯化后用 *Hind* III 酶解。反应条件：10×缓冲液 E 2 μ L，乙酰化 BSA (1mg/mL) 2 μ L，DNA 底物 2 μ g，限制性内切酶 2–4u，补充三蒸水至 20 μ L。混合后将反应管置 37℃水浴保温 0.5h。

把酶切后的产物用平衡酚–氯仿–异戊醇抽提，无水乙醇沉淀 DNA 后溶于 10 μ 无菌水，用 Klenow 酶大片段进行填平。反应条件：10×缓冲液 10 μ L，乙酰化 BSA (1mg/mL) 2 μ L，DNA 底物 2 μ g，Klenow 酶 2–4u，补充三蒸水至 50 μ L。混合后将反应管置室温 10min。

连接反应：在无菌的 Eppendorf 管中加入 10×T₄DNA 缓冲液 5 μ L，经消化填平的载体 DNA 5 μ L 和 PCR 扩增产物 10 μ L，T₄DNA 连接酶 1 μ L，补充无菌三蒸水至 50 μ L，16℃过夜反应。

3.6 重组 DNA 的转化

2.6.1 感受态细胞的制备

将 27℃培养过夜的根际土生优势菌 Tu-1 和 Tu-7 菌或表面活性剂产生菌铜绿假单胞菌培养物分别按 1:10 的比例转入另一新鲜的 LB 培养液中，振荡培养至对数生长期 (OD₆₀₀=0.6)，冰浴培养液 10min，经 4, 000g, 4℃离心 10min，用 10mL 预冷的 0.1mol/L CaCl₂ 溶液沉淀，再用同样预冷的 CaCl₂ 溶液悬浮细胞，即为感受态细胞。

2.6.2 转化

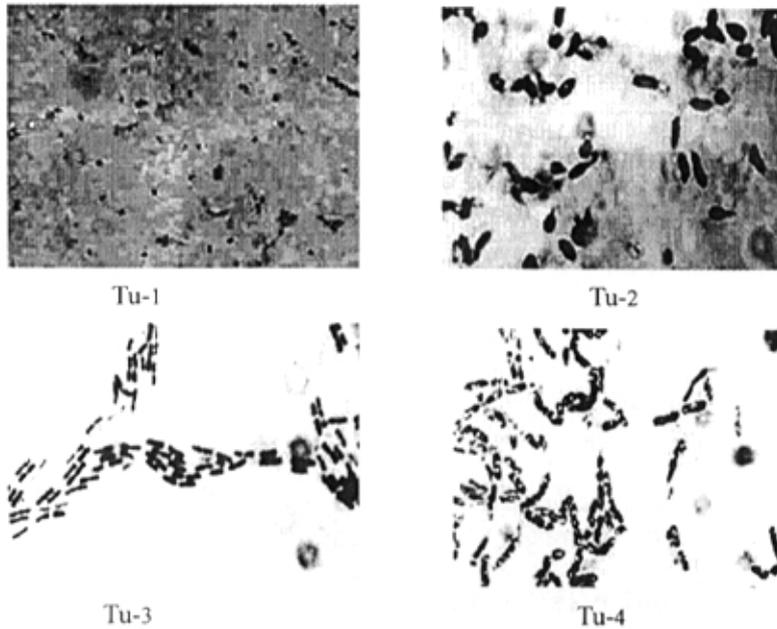
取 200 μ L 感受态细胞加到无菌的 Eppendorf 管中，每管加 EGFP 与载体 DNA 的连接产物 10 μ L 或是提取的 pGFP 质粒载体，混合均匀，冰浴 30min 后，将 Eppendorf 管于 42℃水浴中放置 90s，快速转移到冰水中，放

置 1—2min; 再加入 400 μ L LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 45min。取 200 μ L 上述培养物涂布在含 Km (10ng/mL Km 和 10ng/mL Cm) 的 LB 平板上, 置 27 $^{\circ}$ C 培养 12—16h。

4. 结果与分析

4.1 黄麻根际优势细菌的分离与筛选

对供试用土壤, 经栽种黄麻后, 在麻苗根际中分离微生物。结果表明在麻苗根际含有大量的细菌, 每 g 土壤含量可高达 10^5 — 10^6 菌落形成单位 (Colony Forming Unit, CFU) (平均值)。从中分别挑取不同类型的细菌菌落, 经平板筛选菌数最多、生长速度最快 9 个菌株。其菌体形态通过显微观察 (图 9)。



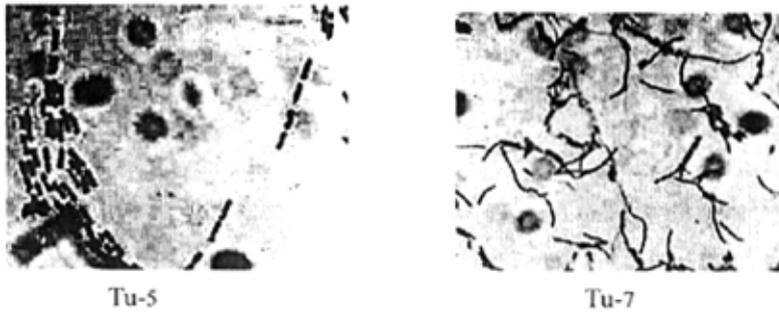


图9 黄麻根际优势菌的显微观察

Fig 9 The configuration of bacteria from jute rhizosphere

几种优势菌特征列于表 10。其中 Tu-1 菌落为乳白色球状，形态较大。其在 KB 平板上生长速度最快，数量较多。而 Tu-7 为透明的小球状菌落，生长速度比 Tu-1 慢，但数量最多，在黄麻根际具有生长优势，选择作为根际降解耦合系统的构建菌株。

表 10 分离的土壤优势菌株性状特

Table 10 comparison of characteristics in bacteria of rhizosphere

菌株号	菌落颜色	细菌形状	革兰氏染色	平板菌落计数 (个)	菌落大小 直径 (mm)
Tu-1	白色球形大菌落	点状	G ⁻	45	4.5
Tu-2	乳白色不规则有褶皱	杆状	G ⁺	3	3
Tu-3	乳白色球形	杆状	G ⁻	4	1.8
Tu-4	黄色树根状	杆状	G ⁺	1	-
Tu-5	乳白色小球形	杆状	G ⁺	3	2.1
Tu-7	透明球形小	杆状	G ⁻	500	1.2

* G⁺: 革兰氏染色为阳性 G⁻: 革兰氏染色为阴性

4.2 Tu-1 和 Tu-7 菌株生长曲线

为了确定菌株的生长速率，测定出发菌株 Tu-1 和 Tu-7 的生长曲线（见图 11）。从图 11 可知，Tu-1 和 Tu-7 生长繁殖快，停滞期很短，接入新鲜 LB 培养液 3 小时后进入对数生长期，15 和 17 小时后达到稳定期。

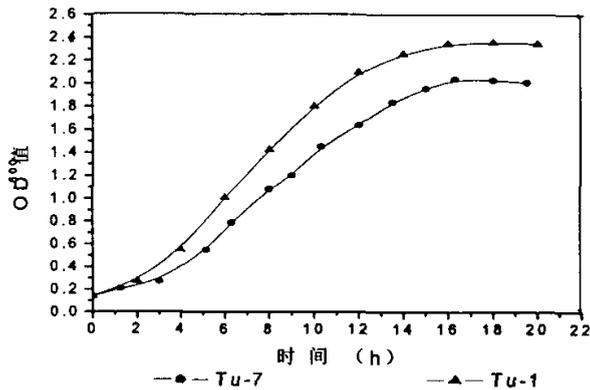


图 11 Tu-1 和 Tu-7 的生长曲线
 Fig 11 The curve of Tu-1 and Tu-2 growth

4.3 基因 EGFP 的 PCR 扩增

以制备的含 EGFP 质粒 DNA 为模板，使用合成引物进行 PCR。上游引物中设计有 *Bam*HI 酶切位点，下游引物含有 *Hind*III 酶切位点；PCR 扩增产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳，其 DNA 分子量与基因 EGFP 片段大小（717bp）一致（见图 12）。

4.4 重组质粒的构建

由于质粒在不同的宿主细胞中存在的稳定性不一致，在有些细胞中很容易丢失而造成标记不准确，不利于根部定殖的研究。我们选用带有 Tn5 转座子的质粒 TnMod-Ocm 作为载体，与 EGFP 基因的扩增产物进行连接。TnMod-Ocm 的酶切图谱见图 14。研究表明 Tn5 转座子在革兰氏阴性菌中有很高的转座几率，可高达 10^{-3} 。我们希望通过 Tn5 转座子的转座功能将 EGFP 基因转座到宿主的染色体上，提高其存在的稳定性。

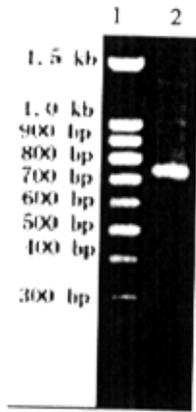


图 12 EGFP PCR 扩增产物

Fig 12 EGFP amplified by PCR

1. 100bpDNA ladder
2. EGFP PCR 扩增产物



图 13 TnMod-Ocm 质粒 *Hind*III 单酶切

Fig 13 TnMod-Ocm digest with *Hind*III

1. λ DNA /*Hind*III Marker
2. TnMod-Ocm
3. TnMod-Ocm/ *Hind*III

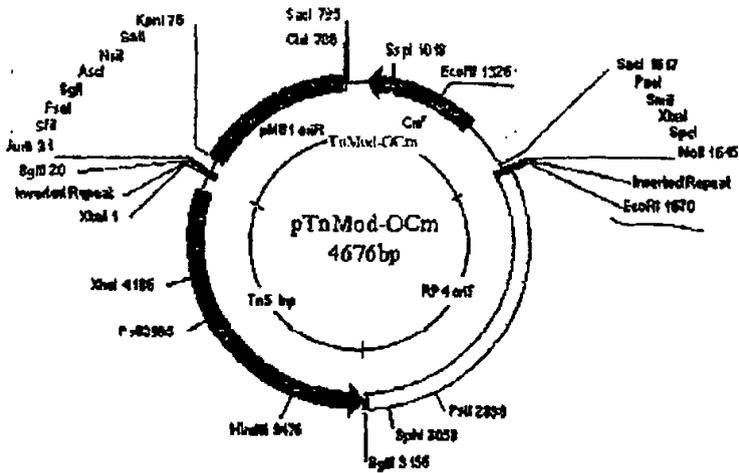


图 14 载体质粒 TnMod-Ocm 图谱

Fig 14 Schematic representation of the donor plasmid TnMod-Ocm

提取质粒 TnMod-Ocm。用 *Hind*III 单酶切 1.5h, 0.7% 凝胶电泳检验如图 13 所示。用根据 EGFP 基因的核苷酸序列, 设计了 P1 和 P2 引物, 其中 P1 为 EGFP 蛋白 N 端的核苷酸互补序列, P2 为蛋白 C 端的核苷酸序列的互补序列, 为便于克隆表达, 在 P1 和 P2 中分别引进了 *Bam*HI 和 *Hind*III 位点。以 P1 和 P2 为引物, 以制备的含 EGFP DNA 为模板按上述实验条件以 PCR 扩增 EGFPcDNA。PCR 产物经低熔点胶纯化后, 克隆进 TnMod-Ocm 的 *Hind*III 位点, 构建 TnMod-Ocm/EGFP。其中 TnMod-Ocm/EGFP 含有 Tn5 转座子, CM 编码区以及多克隆位点等。

4.5 GFP 和 EGFP 基因的表达

通过 CaCl_2 感受态细胞制备方法分别将质粒 pGFP 和 pTnMod-Ocm/EGFP 转化 Tu-1 和 Tu-7, 48h 后在 pGFP 转化的含相应抗生素的 LB 培养基上可观察到绿色单菌落, 在紫外灯下发强烈绿色荧光。挑取转化平板上的荧光最强的菌落接入斜面保存。转化子命名为 Tu-1A 和 Tu-7A, GFP 基因在 Tu-1A 和 Tu-7A 中为组成型表达。

而通过 EGFP 扩增与 pTnMod-Ocm 连接而成的新的构建质粒转化受体菌 Tu-1, 在选择性平板上也得到在自然光下表达强烈绿色的转化子, 肉眼即可分辨, 转化子命名为 Tu-1B。与 Tu-1A 和 Tu-7A 在平板上的单菌落相比前者绿色较深。

图 A 为显微镜下观察的无 EGFP 的细胞, 图 B 为转化子的荧光照片。由图 B 可见, 由于 EGFP 基因在 Tu-1 细胞中的高效表达, 部分细胞的 EGFP 含量很高, 在荧光下就可见到表达产物 EGFP 被激发的强烈荧光。在被转换之后的转化子平板上, 肉眼可见单个菌落呈现明显的绿色。

将携带有 pGFP 基因的质粒转入铜绿假单胞菌的细胞中, 在含有氨基青霉素的平板上也得到大量的转化子, 绿色肉眼可见。进一步观察转化子发现其细胞形态与宿主细胞形态很相似, 但菌落的颜色与受体菌明显不同, 在普通光照下为绿色 (如图 C,D), 在紫外光下呈现出绿色荧光。通过荧光显微镜进行荧光检测, 细胞发出绿色荧光。

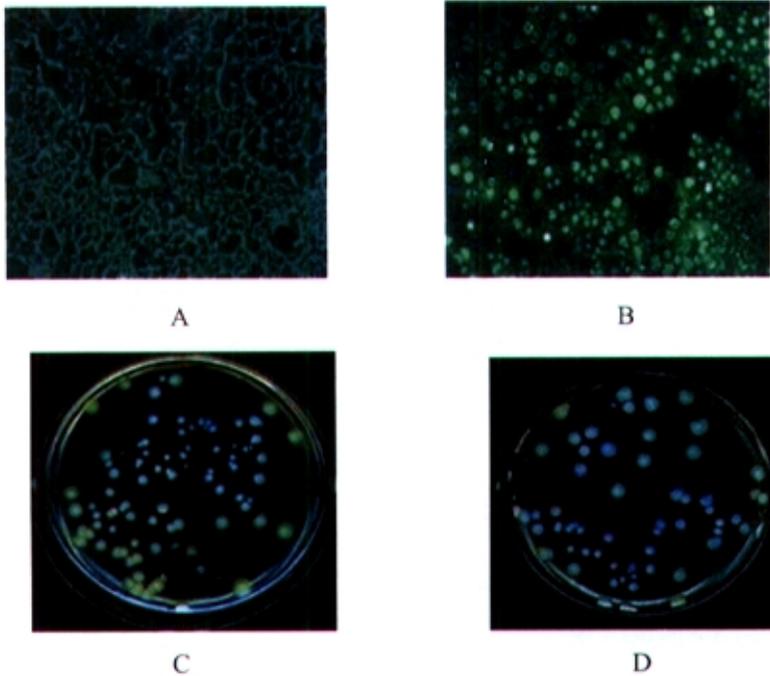


图 15 转化子中 pGFP 和 EGFP 高效表达

A 未转化 Tu-1 在荧光下的对照；B 转入 pTnMod-Ocm/EGFP 的 Tu-1 在荧光下激发强烈绿色荧光 C, D 在自然光下含 pGFP 质粒的铜绿假单胞菌转化子平板

Fig 15 Express of EGFP and GFP gene in cells

A The normal cells under fluorescence light

B The cells emitting striking green fluorescence under fluorescence light

C,D Bacterial colonies emitting green fluorescence on plate under general light

挑取重组质粒 pTnMod-Ocm/EGFP 转化 Tu-1，在氯霉素平板上表达强烈绿色荧光的单菌落，提取质粒，结果如图 16。未发现在原来的 4.6kb 位置有质粒带存在，但转化子又表达强烈绿色荧光，我们设想，所转入的质粒 pTnMod-Ocm/EGFP 由于 Tn5 转座子的转座作用，已随机的插入 Tu-1 的染色体上，所以用 CaCl_2 法无法提取出质粒。要想进一步证明需进行分子杂交实验。



图 16 pTnMod-Ocm/EGFP 转化子质粒的提取

Fig 16 plasmid in pTnMod-Ocm/EGFP transformant

1. pTnMod-Ocm
2. λ DNA /HindIII Marker
3. 转化子提取质粒

5. 小结

研究结果表明, GFP 和 EGFP 基因在黄麻根际优势菌株 Tu-1、Tu-7 和 *P.aeruginosa* 中得到了高效表达, 表达的蛋白能在荧光显微镜下被激发出强烈的荧光, 为今后在根际微生物耦合降解系统中充分利用这一非常灵敏且极易检测的新型报告基因提供了一条途径。

携带质粒 pGFP 的 Tu-1A 和 Tu-7A 中 GFP 为组成型, 研究表明, pGFP 在 Tu-1A 和 Tu-7A 中连续传代 10 代, 质粒的稳定性约为 18%, 可能的原因, 一是由于外源质粒的引入, 增加了宿主菌新陈代谢的负荷, 进而影响质粒的稳定性; 二是宿主重组体系对载体质粒稳定性的影响。

本实验用的 TnMod-Ocm 质粒含有 Tn5 转座子, 研究表明在革兰氏阴性菌中有很高的转座几率, 可高达 10^{-3} 在用 *Hind*III 酶切后填平与 PCR 产物连接转化受体菌 Tu-1 中得到相应的转化子, 与直接用 pGFP 转化得到的转化子相比, 绿色荧光更强烈, 且稳定存在。由于在转化子中未提取到 TnMod-Ocm 质粒, 我们设想由于 Tn5 到转座作用, 已将带有 EGFP 基因片断的质粒插入染色体中, 进一步证明需进行分子杂交检测。

同时研究发现 GFP 标记细菌所发荧光的强度与选用的 GFP 类型、GFP 基因的拷贝数和表达量及宿主细胞的生理状态相关，不同标记菌之间的荧光强度可能差异很大。我们也试图多次将质粒 pGFP 转入蕙降解菌 AN-2' 中，但均未发现其表达。

第五章 标记菌株电融合及融合子的筛选

1. 引言

在细胞融合技术上传统的分为两种:化学诱导融合和物理诱导融合。前者常用 PEG、DMSO、Ca⁺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^[99]。电融合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兼而有之的融合技术。

电融合通常是利用电融合仪,电融合处理包括两个步骤:第一步为双向电泳(dielectrophoresis),将原生质体置于低导电率融合液的小室中,然后在小室的两极间加入高频交流电场,原生质体的表面电荷发生极化,此时的原生质体便形成与电场平行的链,即所谓的“珠串”。第二步是施加一次或多次足够的瞬时直流高压电脉冲,以引起可逆性电击穿。互相接触的质膜瞬间被电击破后,又迅速连接闭合,恢复成嵌合质膜形成融合体。在原生质体开始融合时,应短时重复施加交流电场以保持原生质体间的紧密结合状态,然后使电场强度慢慢降至零。

电融合技术主要有融合频率高、融合迅速和毒害小等优点。电融合的技术参数概括起来主要有几个方面:(1)电极的材料与间距:电极类型对外电场的各项参数及融合效应有很大的影响,常用的有铂平行电极,镀银电极和镍铬合金电极。Jones^[100]认为铂电极适用于动物细胞,对植物细胞效果较差。两电极的间距一般为 1-2mm。(2)融合液与原生质体的密度:融合液成分包括渗透压稳定剂的种类如甘露醇、Ca⁺等,以及使用的浓度和 pH 值等。在不损伤原生质体活力的前提下,降低渗透压可提高融合率。而原生质体的密度对融合的效果也有显著的影响,当密度低于 10⁴个/ml 时,显著降低融合率,高于 10⁵个/ml 时,原生质体则成团状融合,达不到预期的效果^[101]。一般认为 2-8×10⁴个/ml 的原生质体密度是适宜的。双亲原生质体混合的比例按其自体融合的难易而定,如融合能力相近,按 1:1 混合,如差异太大,则可按 1:5 至 1:10 混合^[100]。(3)交变电场强度:交变电场强度决定原生质体“珠串”形成的质量和速度,交流电场的频率常用范围在 10KHz-20MHz 之间,电场强度在 20-350v/cm 之间。在此范围内,

原生质体排列速度随电场强度增大而增大，电场强度超过 350v/cm 原生质体易发生崩解。该参数的变化与电极的类型、间距以及融合液的导电率有关。若双向电泳不能完成，多是导电率太高之故。(4) 直流脉冲的强度、宽幅和个数：一般适宜的直流方波脉冲电场强度为 300-2000v/vm，宽幅 5-50us。

电融合在植物体细胞杂交中得到了成功的应用，1985 年 Tempelaar 等在大麦、小麦等原生质体电融合实验中，获得异核经培养可分裂并进一步得到克隆。Morikawa 等^[102]报道了电融合获得烟草体细胞杂种再生植株。Terada 等把水稻和稗属原生质体经电融合处理也得到杂种植株。Ushijima 等人曾报道米曲霉和酱曲霉种间电融合，融合后可比较淀粉酶产量挑选重组子，结果柠檬酸产量提高了七倍。

我们利用带有抗性标记的生物表面活性剂产生菌和绿色荧光蛋白标记的土壤优势菌在 CRY-3 型电融合仪上进行电融合，研究各种参数对其融合的影响以确定最佳的融合条件。

2. 材料

2.1 供试菌株与培养基

黄麻根际优势菌：Tu-1A (AP^sEM^s) 带有绿色荧光蛋白标记。

产表面活性剂菌株：具有良好的产表面活性剂能力且带有多种抗性铜绿假单胞菌 P₇₋₅₀ (AP^sEM^R)。

降蒎菌株：AN-2'。

完全培养基用于供试菌株的继代培养。原生质体培养于再生培养基是含有渗透压稳定剂的完全培养基。

铜绿假单胞菌的完全和再生培养基（同第二章）。

降蒎菌株的完全和再生培养基（同第三章）。

2.2 试剂

渗透压稳定剂 (SMM) (同第二章)。

电击缓冲液 (PM): 0.6mol/L 甘露醇、0.02mol/L 的 CaCl₂，用无菌水

配置, 调制 pH6.0。

溶菌酶溶液: 终浓度分别为 1mg/ml 为 2mg/ml, 用渗透压稳定剂配置, 过滤除菌。

2.3 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。

3. 方法

3.1 原生质体的制备

将亲株 P_{7.50} (AP^sEM^R), 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 6h 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 1mg/ml, 置 37 °C 水浴保温 0.5h, 2000r/min 离心 10min 收集原生质体。

亲株 AN-2', Tu-1A 分别取培养至对数生长期前期的细胞, 在溶菌酶终浓度为 2mg/ml, 酶解时间在 0.5h 时制备的原生质体, 具体方法同上。

3.2 原生质体的电融合

将荧光蛋白标记的 Tu-1A (AP^rEM^s) 和 P_{7.50} (AP^sEM^R) 原生质体悬液 (10⁸ 个/ml) 等量混合, 用电击缓冲液洗涤三次。最后离心沉淀用缓冲液悬浮。用无菌吸管将两亲本原生质体混合液取 1ml 注入电融合小池, 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 350V、450V、550V, 脉冲幅宽 5us, 脉冲个数 2, 脉冲间隔 50s, 进行电融合。室温放置 15min, 取出原生质体融合液, 用 SMM 液作适当稀释, 取原液 10⁻¹、10⁻² 各 0.2ml 涂布再生含红霉素和氯霉素平板, 30°C 倒置培养 48h。

将具有高效降葱能力的 AN-2' 制备的原生质体用上述的同样方法与

Tu-1 原生质体混合，经电融合后取融合液，稀释涂布于含葱 100mg/L 和卡那霉素的高渗选择性平板上，28℃倒置培养 48h。

用 CRY-3 型电融会议进行原生质体融合。该仪器的电压、频率、脉冲幅宽、个数及间隔时间均可调节。电极为相距 0.5mm 的两条银丝做融合试验。

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%）。

3.3 融合子检出及测定

对带有绿色荧光蛋白标记的 Tu-1A 菌株和 AN-2' 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。

4. 结果与分析

4.1 融合子选择平板的确定

经过对 Tu-1A 和 AN-2' 进行多种抗生素的检测，发现 Tu-1A 具有氨苄青霉素抗性并在含葱 100mg/L 的高渗培养基上不生长，而 AN-1' 为卡拉霉素敏感型，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。

而 P₇₋₅₀ 为红霉素抗性，氨苄青霉素敏感型（见第二章），Tu-1A 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。

表 12 融合子选择平板的确定

Table 12 Determine the plate of isolation the fusants

菌株	卡那霉素抗性 100 μ/mL	葱高渗平板 100 mg/L	红霉素 100 μ/mL	氨苄青霉素 100 μ/mL
Tu-1A	+	-	-	+
AN-2'	-	+	-	-
P ₇₋₅₀	-	-	+	-

4.2 高频交流电场对原生质体电融合的影响

电融合过程分两步进行，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 分钟。

3.2.1 交流频率 (kHz)

在交流电场强度 20V/cm，脉冲强度 300V/cm，脉冲幅宽 5 μ s，脉冲个数为 2 的情况下交流频率的影响

表 13 交流频率对原生质体融合的影响

Table 13 The effect of AC frequency on protoplast electrofusion

交流频率 (KHz)	Tu-1A 与 P ₇₋₅₀ 融合率	Tu-1A 与 AN-2' 融合率
10	0	0
500	9.3%	11.6%
750	8.7%	11.2%
1000	9.3%	10.8%

从表 13 可知，交流电场的频率从 500kHz 增加到 1000kHz 范围内，交流频率对原生质体融合率影响不大。但当交流频率低于 10kHz 时，观察到部分原生质体有旋转现象，这说明交流频率太低会引起原生质体共振旋转^[106]。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 500kHz 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选用 500kHz。

3.2.2 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 300V/cm，脉冲幅宽 5 μ s，脉冲个数为 2 时，交流电场强度在 20—40V/cm 范围内，总融合率较为稳定（表 14）。

表 14 交流电场强度对原生质体电融合的影响

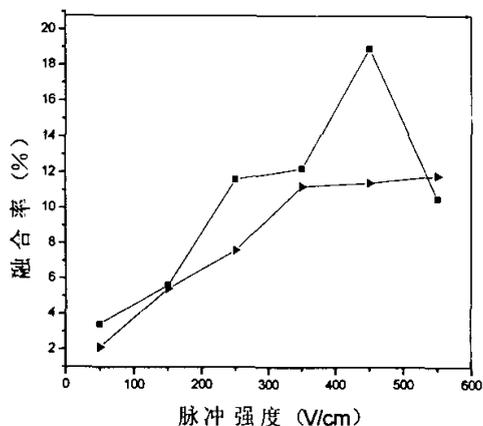
Table 14 The effect of AC strength on protoplast electrofusion

电场强度 (V/cm)	Tu-1A 与 P ₇₋₅₀ 融合率	Tu-1A 与 AN-2' 融合率
10	0	0
20	5.3%	8.6%
30	6.7%	11.4%
40	5.4%	11.8%

4.3 直流脉冲对原生质体电融合的影响

3.3.1 脉冲强度

如图 17 所示, 当脉冲幅宽固定为 5 μ 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 450V/m 时,



—■—Tu-1A与 AN-2'原生质体融合液 —▶—Tu-1A与 P₇₋₅₀原生质体融合液

图 17 脉冲强度对原生质体电融合的影响

Fig 17 The effect of pluse strength on protoplast electrofusion

Tu-1A 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 Tu-1A 与 P₇₋₅₀原生质体融合液在脉冲强度达到 350V/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。

3.3.2 脉冲个数

当脉冲幅宽固定为 5us，从图 18 中可以看出，两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，两种原生质体融合液的融合率稍有增加后开始下降。

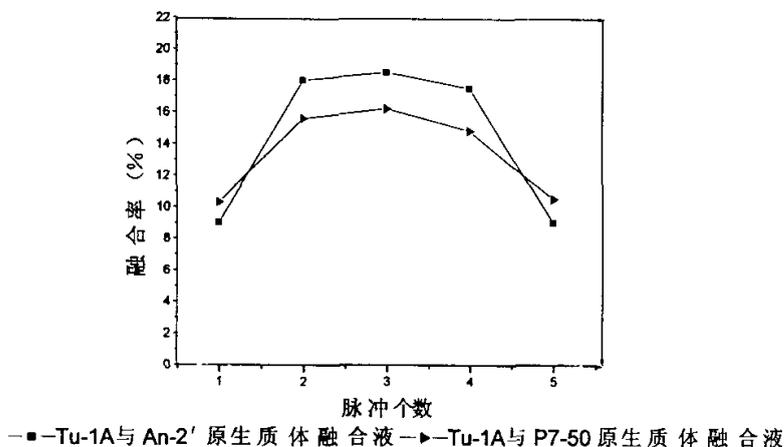


图 18 脉冲个数对原生质体电融合的影响

Fig 18 The effect of number of pulse on protoplast electrofusion

4.4 原生质体电融合的观察

融合操作在倒置显微镜的观察下进行。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 450V/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，有少数是三个以上融合成一个。个别较脆弱的原生质体在电击后破裂消失。

4.5 融合子的筛选与性状测定

在 Tu-1A 与 P₇₋₅₀ 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 P₇₋₅₀ 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达较强的

绿色。与亲株 Tu-1A 颜色相似，如图 19 所示。

而 Tu-1A 与 AN-2' 原生质体融合后在含葱 100mg/L 的高渗培养基上得到两种形态的菌落，一种菌落较小（直径约为 0.1mm），菌落为半透明的球形，菌落形态与 AN-2' 相似，在紫外灯下观察没有绿色荧光表达。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 Tu-1 相似，紫外光下表达微弱绿色荧光。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，而后者表达强烈绿色荧光。因为 Tu-1A 在含葱 100mg/L 的高渗培养基的对照上不生长，所以可以肯定，这种表达绿色荧光且在含葱平板上生长的菌株为两株亲株的融合子。

把这两种融合子，对其进行多次传代培养，挑选出几株生长稳定，接入斜面保存。



图 17 在自然光下 Tu-1A 与 P_{7.50} 融合子

Fig 17 Fusants under the general light of Tu-1A and P_{7.50}

5. 小结

对绿色荧光蛋白标记好的 Tu-1A 进行了各种抗生素检测，发现其对红霉素敏感，同时由于 pGFP 质粒的转入使其带有氨苄青霉素抗性。而 P_{7.50} 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。

由于 Tu-1A 为卡那霉素抗性并在含葱 100mg/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。

P₇₋₅₀ 和 AN-2 取培养到对数生长期前期的细胞, 在溶菌酶终浓度分别为 1mg/ml 和 2mg/ml。酶解时间在 0.5h 制备的原生质体。与绿色荧光蛋白标记的 Tu-1A 制备的原生质体在电融会议上进行电融合。在交流电场强度 30V/cm; 交流频率 500kHz; 脉冲强度 450V/cm; 脉冲宽度 5 μ s; 脉冲个数为 2 时得到融合子 2 株。同时在研究中发现经融合后在选择性平板上生长的融合子表达绿色荧光不强, 但经过重新点种后能表达较强的绿色荧光。

主要参考文献

- [1] Jacob J, Karcher W. Polycyclic aromatic hydrocarbons of environmental and occupational importance . *Fresenius Z Anal Chem*,1986,233:1-10
- [2] M E. Zappi, B A. Rogers, et al. Bioslurry treatment of a soil contaminated with low concentrations of total petroleum hydrocarbons, *Journal of Hazardous Materials*, 1996, 46(1):1-12
- [3] Meyer S Steinhart H. Fate of PAHs and Hetero-PAHs during Biodegradation in a Model Soil /Compost-System: Formation of Extractable Metabolites. *Water, Air, Soil Pollut.* 2001,132:215-231
- [4] Eaton R W, Chapman P J. Bacterial metabolism of naphthalene; construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxy-naphthalene and subsequent reactions. *J Bacteriol*,1992,174;7542-7554
- [5] Lloyd-Jones G, Laurie A D, Hunter d, et al. Analysis of catabolic genes for naphthalene and phenanthrene degradation in contaminated New Zealand soils. *FEMS Microbiology Ecology*,1999,29;69-79
- [6] Liu Z, Lasa A, Luthy R G. Surfactant solubilisation of PAH compounds in soil-water suspensions. *Water Sci Technol*,1991,23:475-485
- [7] Arino S, Marchal R, Vandecasteele J P. Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996,45:162-168
- [8] Deziel E, Paquette G, Villemur R, et al, Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol*, 1996,62:1908-1912
- [9] Grosser R J, Warszewsky D, Robie V J. Indigenous and enhanced mineralisation of pyrene benzo(a)pyrene and carbazole in soils. *Applied and Environ Microbiology*, 1991,57:3462-3469
- [10] Sarney D B, Bulfen E N. Application of enzymes to the synthesis of surfactants. *Trends Biotechnol.*,1995,13:164-172
- [11] Cooper D G. Biosurfactants. *Microbiol. Sci.*, 1986,3:145-149

- [12] 陈坚,华兆哲,伦世仪.生物表面活性剂在环境生物工程中的应用.环境科学,1996,17(4):84-87
- [13] Kitamoto D, Ikegami T. et al. Microbial conversion of n-alkanes into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma*. *Biotechnol. Lett.*2001, 23:1709-1714
- [14] Kuyukina M S, Ivshina I B et al. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *J. Microbiol. Methods*.2001,46:149-156
- [15] Scheibenbogen K, Zytner R G, Lee H et al. Enhanced removal of selected hydrocarbons from soil by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants and some chemical surfactants. *J Chem Technol Biotechnol*, 1994;58:53-59
- [16] Van Dyke M I, Couture I P, Brauer M et al. *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants; structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil.*Can.J.Microbiol.*,1993,39:1071-1078
- [17] Herman D C, Artiola J F, Miller R M et al. Removal of cadmium lead, and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant.*Environ.Sci.Technol*,1995,29:2280-2285
- [18] Phillips T , Seech A F, et al. Bioremediation of soil containing lindane and other hexachlorocyclohexane isomers. 1st European Bioremediation Conference. 2001,1:2-5
- [19] Patel M N, Gopinathan K P. Lysozyme-sensitive bioemulsifier for immiscible organophosphorus pesticides. *Appl.Env.Microbiol.*1986, 52:1224—1226
- [20] Seech A G. Marvan I J. et al. In situ, on site bioremediation of industrial soils containing chlorinated phenols and PAHs. *Emerging Technologies for Hazardous Waste Management*. 1992, 11:21-23
- [21] Mulligan C,Cooper D G. Pressate from peat dewatering as a substrate for bacterial growth. *Appl.Env.Microbiol.*1985,50:160-162
- [22] Rosenberg E et al. Production of biodispersan by *Acinetobacter calcoaceticus* A2. *Appl.Env.Microbiol.*1988,54:317-322
- [23] Rosenberg E et al. Purification and chemical properties of *Acinetobacter calcoaceticus* A2 biodispersan. *Appl.Env.Microbiol.*1988,54:324-326
- [24] O Sullivan M, O Gara F. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. Involved in suppression of plant root pathogens. *Microbial Rev*. 1992,56(4):662-676

- [25] Howie W J, Cook R J, Weller D M, Effects of soil matric potential and cell motility on wheat root colonization by fluorescent pseudomonas suppressive to take-all, *Phytopathology*. 1987,77:286-292
- [26] Weller D M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu Rev Phytopathol*.1988,26:379-407
- [27] Kloepper J W, Lifshitz R, Schroth M N. Pseudomonas inoculants to benefit plant production. *Animal and Plant Sciences*. 1988,24,60-64
- [28] Kloepper J W, Zablotowicz R M, Tipping E M et al. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers, In: Keister D L, Cregan P B ed, *The Rhizosphere and Growth*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991.315-326
- [29] Parke J L. Root colonization by indigenous and introduced. *Microorganisms*. In: Academic Publishers, 1991.33-42
- [30] Beauchamp C J, Kloepper J W et al. Root colonization of faba bean (*Vicia faba* L.) and pea (*Pisum sativum* L.) by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in the presence of nitrate-nitrogen. *Can. J. Microbiol* .2001,47: 1068-1074
- [31] Suslow T V. Role of root colonizing bacteria in plant growth. In: Mount M S, Lacy G H ed. *Phytopathology*. 1982,72:111-115
- [32] Baker R. Induction of rhizosphere competence in the biocontrol fungus *Trichoderma*. In: Keister D L, Cregan P B ed. *The Rhizosphere and Plant Growth*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991.33-42
- [33] Hozone E, Alexander M. Bacterial characteristics important to rhizosphere competence. *Soil Biol.Biochem*. 1991,23(8):717-723
- [34] Bowen G D, Rovira A D. Microbial colonization of plant roots. *Annu Rev Phytopathol*.1976,14:121-144
- [35] Bowers J H, Parke J L. Colonization of pea taproots by *Pseudomonas fluorescens*: effect of soil temperature and bacterial motility. *Soil Biol Biochem*. 1993,25 (12): 1693—1701
- [36] Parke J L, Rovira A D, Bowen G D. Soil matric potential affects colonization of wheat roots by a pseudomonad suppressive to take all. *Phytopathology*. 1984,74;806-818
- [37] Chao W L, Nelson E B, Harman G E et al. Colonization of the rhizosphere by

- biological control agents applied to seeds. *Phytopathology*. 1986,76:60-65
- [38] Bowen G D. Microbial dynamics in the rhizosphere. Possible strategies in managing rhizosphere populations. In: Keistrer D L, Cregan P B et. *The Rhizosphere and Plant Growth*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993,31:441-472
- [39] Bahme J B, Schroth M N. Spatial-temporal colonization patterns of a rhizobacterium on underground organs of potato. *Phytopathology*. 1987,77:1093-1100
- [40] Heijnen C E, Hok-A-Hin C H, Van Elsas J D. Root colonization by *Pseudomonas fluorescens* introduced into soil amended with bentonite. *Soil Biol Biochem*. 1993,25(2):239-246
- [41] Liddell C M, Parke J L. Enhanced colonization of pea taproots by a fluorescent pseudomonad biocontrol agent by water infiltration into soil. *Phytopathology*. 1989,79:1327-1332
- [42] Scher F M, Ziegler J S, Kloepper J W. A method for assessing the root-colonizing capacity of maize. *Can J Microbiol*. 1984,30:151-157.
- [43] Brown S L, Curl E A, et al. Rhizosphere effect of herbicide-stressed sicklepod (*Cassia obtusifolia*) on chlamydospores of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* 1987 71:919-922
- [44] Van Peer R, Schipper B. Plant growth responses to bacteriazation and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. *Can J Microbiol*. 1989,35:456-463
- [45] Mazaola M, Cook R J. Effect of fungal root pathogens on the population dynamics of biocontrol fluorescent pseudomonads in the rhizosphere of wheat. *Appl Environ Microbiol*. 1991,57:2171-2168
- [46] Cheng L, Fu J, Tsukamoto A, Hawley R G. Use of green fluorescent protein variants to monitor gene transfer and expression in mammalian cells, *Nature Biotechnology*, 1996,14:606-609
- [47] Yen E, Gustafson K, Boulianne G L. Green fluorescent proteins as a vital marker and reporter of gene expression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1995,92:7036-7040
- [48] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward W W, Prasher D C. Green fluorescent proteins as a marker for gene expression. *Science*, 1994,263:802-8056

- [49] Verma In M. "Green light" for gene transfer. *Nature Biotechnology*, 1996,14:576-570
- [50] Prasher D C, Eckenrode V K, Ward W W, et al. Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene*, 1992,111:229-233
- [51] Hiroshi Morise, Osamu Shimomura, Frank H Johnson. Intermolecular energy transfer in bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry*, 1974,13:2656-2662
- [52] Pang A Z, DeBoer D L, Wan Y. et al. An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants. *Plant-Physiol*, 1996,112:893-900
- [53] Jim Haseloff, Kirby R Siemering. Douglas C Prasher, et al. Removal of acryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *A. rabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 2122-2127
- [54] Van West P, Reid B, Campbell T A. Green-fluorescent-protein as a reporter gene for the plant pathogenic oomycete *Phytophthona palmivora*. *FEMS Microbial Lett*, 1999, 178(1):71-80
- [55] Bokman S H, Ward W W. Renaturation of *Aequorea* Green-Fluorescent Protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1981;101:1372
- [56] Ward W W, Cody C W, et al. Spectral perturbations of the *Aequorea* green-fluorescent protein *Photochemistry and Photobiology*, 1982;35:803-808
- [57] Prasher D, Eckenrode V K, Ward W W et al. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 1992;11:229
- [58] 岳莉莉, 齐义鹏等. 绿色荧光蛋白——现代细胞生物学与分子生物学研究领域的
新标记物, *生物工程与进展* 1997, 4:11-13
- [59] Inouye S and Tsuji F I. Evidence for redox forms of the *Aequorea* green fluorescent protein . *FEBS Lett*, 1994;341:277
- [60] Delagrave S, Hawtin R E, Silv C M et al. Red-shifted excitation mutants of the green fluorescent protein. *Bio Technology*, 1995;13:151
- [61] Wang S, Hazelrigg T. Implications for *bcd* mRNA Localization from spatial distribution of *exu* protein in *Drosophila oogeuesie*. *Nature*, 1994,369:400-403
- [62] Davis I, Girdham C H, O Farred P H. A nuclear GFP that marks nuclei in living *Drosophila* embryos, maternal supply overcomes a delay in the appearance of zygotic fluorescence. *Developmental Biology*,1995,170: 726-729

- [63] Yokoe H, Meyer T. Spatial dynamics of GFP-tagged proteins investigated by local fluorescence enhancement. *Nature Biotechnology*, 1996. 14:1252-1256
- [64] Takada T, Iida K, Awaji T, Itoh K, Takahashi R, Shibui A, Yoshida K, Sugano S, Tsujimoto G, Selective production of transgenic mice using green fluorescent proteins as a marker. *Nature Biotechnology*, 1997,15:458-461
- [65] 汪和睦, 汪洲, 细胞电穿孔与电融合的机理及应用. *生物化学与生物物理进展*, 1994,4: 322-326
- [66] 刘新平等, 植物细胞融合研究. *世界农业* 1994,3:29-32
- [67] Negrutin, I et al. Amino acid auxotrophs from protoplast cultures of *Nicotiana glauca*. I. BUdR enrichment selection, plant regeneration, and general characterisation. *Molecular and general genetics*. 1985,199:330-337
- [68] Davis L C et al. Modeling the effects of plants on the bioremediation of contaminated soil and groundwater. *Environ. Prog*, 1993,12(1):67-75
- [69] Reynolds C M et al. Plant enhancement of indigenous soil microorganisms: a low-cost treatment of contaminated soils. *Polar Record*, 1999,35(192): 25-30
- [70] John J Z et al. Recent Applications of phytoremediation technologies. *Remediation*, 1999,9(2):29
- [71] 王岩等. 土壤微生物量及其生态效应. *南京农业大学学报*. 1996. 19(4):45-51
- [72] Qlu Xiujin et al. Field study: grass remediation for clay soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons in: phytoremediation of soil and water contaminants symposium 1996,186-199
- [73] Chang Y Y et al. plant-enhanced subsurface bioremediation of nonvolatile hydrocarbons. *J of Environmental engineering*, 1998,124(2):162-169
- [74] Crowley D E et al. Rhizosphere ecology of xenobiotic-degrading microorganisms. In: phytoremediation of soil and water contaminants symposium, 1996,20-36
- [75] Bolert J S et al. Field-Scale evaluation of in situ bioaugmentation for remediation of chlorinated solvents in groundwater. *Environ. Sci. Technol*, 1999,33(16):2771-2781
- [76] 常志州等. 两种土壤上接种微生物对提高石油降解率的影响. *农业环境保护*, 1998, 17(1): 15-17
- [77] 张清敏等. 强化土壤生态系统净化机能的研究进展, *环境科学进展*, 1999,17(1):18-23

- [78] Barbeau C et al. Bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soil by bioaugmentation using activated soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997,71(1):119
- [79] Boopathy R et al. surfactant-enhanced bioremediation of soil contaminated with 2,4,6-Trinitrotoluene in soil slurry reactors, *water Environ. Res.*, 1999,71(1):119
- [80] Zhaohui Li et al. Long-term chemical and biological stability of surfactant-modified zeolite. *Environ. Sci. Tech.*, 1998,32(17):2628-2632
- [81] Lajie C A. Development of field application vectors for bioremediation of soil contaminated with polychlorinated biophenylys. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993, 59(6):1735-1741
- [82] 程树培等. 光合细菌与酵母跨界融合子降解味精废水性能测定. *环境科学*. 1996,17(3):5-7
- [83] Struthers J K. Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *Appl. Environ. Micro.* 1998,64(9):3368-3375
- [84] Catherine N et al. Selecion of Microbes Producing Biosurfactants in Media without Hydrocarbons. *Ferment. Technol.* 1984,62:311-314
- [85] Rocha. C. enhanced oily sludge biodegradation by a tensio-active agent isolate from *Pseudomonas aeruginose* USBC1. *application microbial biotechnol.* 1991, 47(5): 143-151
- [86] Harvey S, Elashvili I P, Brauer M et al. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. *Bio. Technology*, 1990, 8:228-230
- [87] 潘冰峰, 徐国梁, 施邑屏等. 生物表面活性剂产生菌的筛选. *微生物学报*, 1999, 39(3)264~267.
- [88] 杨世辉等, 一种光学显微镜下观察原生质体的染色方法. *微生物学通报*, 2000, 27(1)55~57.
- [89] Egon Stahl, *Thin-Layer Chromatography, a Laboratory Handbook*. Spring-Verlag Belin Heidelberg New York, 1969.
- [90] 汪晶、和德科编. 环境评价数据手册—有毒物质鉴定值. 化学工业出版社, 1988, 第一版, P231
- [91] Christensen, H E. Faichild, E J. *Registry of Toxic Effects of Chemical Substances:*

Prepared by Tracor Jitco Inc, Rockville. MD for National Institute for Occupational Safety and Health. HEW. Publication N.O (NIOSH). 1976,PP76-191

- [92] Bumpus J A. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*,1989,55:154-158
- [93] Hammel K E, Green B, Gai W Z. Ring fission of anthracene by a eukaryote. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991,88:10605-10608
- [95] 王平, 胡正嘉等, 荧光假单胞菌群根部定殖的研究进展. *应用与环境生物学报*, 1996, 4: 555—556
- [96] Cormack B P, Valdivia R, Falkow S. FACS-Optimized mutants of the green fluorescent protein. *Gene*,1996,173:371-374
- [97] Heim R, Cubitt A B, Tsien R Y. Improved green fluorescence. *Nature*, 1995,373-664
- [98] Delgrave S, Hawtin R E, Silva C M, et al. Red-shifted excitation mutants of the green fluorescent proteins. *Bio.Technology*,13:151-154
- [99] 王天池, 林蔡, 电融合技术在植物细胞工程中的应用现状. *植物学通报*,1994,11:19-24
- [100] Jones M G K, Lindsey K, Plant biotechnology in agriculture. *The Biotechnology series* 1988,2:241-245
- [101] Chapel M, Montane M H et al. Viable somatic hybrids are obtained by direct current electrofusion of chemically aggregated plant protoplasts. *FEBS Letters* 1986,1:79-84
- [102] Morikawa H, Iida A et al. Gene transfer into intact plant cells by electroinjection through cell walls and membranes. *Gene*,1986,41:121-124

致 谢

本文是在导师张甲耀教授和方呈祥副教授的悉心指导下完成的，在整个论文设计和实验过程中，一直得到张老师和方老师的精心指导。张老师敏捷独特的思维方式、谦和宽厚的为人和豁达宽广的胸怀给我留下深刻的印象。而方老师严谨认真的治学态度、全面丰富的专业知识以及在生活上和学业上对学生无微不至的关怀，更是让我受益匪浅。在此，谨向张老师和方老师表示衷心的感谢和由衷的敬意。并祝老师身体健康，工作顺利。

此外，中国典型培养物保藏中心的张珞珍老师、郑从义老师，环科的熊治廷老师、杜予民老师、邓南圣老师、郑连爽老师在实验过程中都提供了很多方便和有益的指导。师妹陈琳、季淼、师弟陈效、学友范成鹏、朱石桥、张峻祥等都给予了热情的帮助和支持，另外特别要提到的是小师弟邓欢欢、小师妹王丽萨、杨焰在实验过程中给予我很多帮助，在此一并表示诚挚的谢意！

最后还要向我的父母亲人致以衷心的感谢，感谢父母的养育，感谢你们对我二十年来如一日的精心呵护，无论什么时候你们总是我背后最坚强的后盾。感谢妹妹，感谢妹妹对我一直以来的关心和支持，感谢所有爱护我和帮助我的人！

陈菲莉

2002年5月于珞珈山