文章编号：1000-8608(2009)01-0033-05

利用反向 PCR 鉴定沼泽红假单胞菌中野生质粒

宋智勇， 曲媛媛*， 周集体

（大连理工大学 环境与生命学院，辽宁 大连 116024）

摘要： 为准确研究沼泽红假单胞菌的野生质粒及其携带的基因信息，在常规碱裂解法基础上，对沼泽红假单胞菌 *Rhodopseudomonas palustris* AS1.2352 中野生质粒提取方法进行了优化，优化方法具有易操作、耗时少、纯度高等特点，所得质粒 DNA 纯度和质量均满足进一步分子操作的需要. 同时，利用反向 PCR 技术鉴定该野生质粒，并结合生物信息学方法对其进行分析，比传统的质粒丢失法验证和考察质粒更为省时、可靠和直观. 证明菌株携带 4 个野生质粒，其中 2.3 kb 的质粒序列与 *Escherichia coli* pEC157 Rom-like protein gene 有 97.8% 的同源性，推测 1885～1887 碱基为复制起点.

关键词： 反向 PCR；野生质粒；沼泽红假单胞菌；质粒提取

中图分类号： X172 **文献标志码：** A

0 引 言

沼泽红假单胞菌 *Rhodopseudomonas palustris* 广泛应用于 CO_2 固定、产氢、污水处理，产饲料用蛋白质、色素以及可生物降解塑料（poly-hydroxy-butyrate）等生物质[1~7]. 目前，关于该菌属基因层面的研究大多数集中于产色素基因及其编码蛋白等[6]. 本实验室对沼泽红假单胞菌 *Rhodopseudomonas palustris* AS1.2352 固定 CO_2 和偶氮染料脱色等方面开展了较为深入的研究[1]，考察了 CO_2 固定基因（GenBank AY155466）相关性质. 而质粒 DNA 作为一个重要的遗传信息载体，广泛存在于细菌中，因此质粒的提取和鉴定是分子生物学水平上进一步研究的重要环节. 为深入了解该菌株的遗传信息，对菌株中野生质粒进行研究是十分必要的.

传统鉴定质粒的方法是利用物理或化学的方法消除质粒，再对其功能变化进行考察，但是消除质粒的条件摸索非常耗时. 利用反向 PCR 鉴定质粒则是一个全新的方法. 反向 PCR 是指用反向的互补引物来扩增两引物以外的 DNA 片段，其目的是扩增一段已知序列旁侧的 DNA[8]. 基于反向 PCR 的原理，即所需模板为环形 DNA 这一特性，本文提出将其用于鉴定目的 DNA 样品是否为环形（质粒 DNA）的新思路，以期为其他种属菌株中野生质粒的鉴定提供参考.

1 实验材料与方法

1.1 菌株及培养

沼泽红假单胞菌 *Rhodopseudomonas palustris* AS1.2352 购自中科院微生物研究所，于 LB 培养基中[9]，30 ℃，好氧培养.

1.2 主要试剂

所需试剂均为分析纯，酶制剂、DNA Marker、DNA 回收试剂盒等购自宝生物工程（大连）有限公司.

1.3 沼泽红假单胞菌质粒提取方法

（1）常规提取方法：参见文献[9].

（2）改进的质粒提取方法：挑选菌落后，转接在 LB 液体培养基中，30 ℃ 培养至 $OD_{660}=0.6$（对数生长中前期，约 11 h，时间不可过长）后，采用碱裂解法提取质粒. 具体操作步骤如下：取 4 mL 菌液，4 ℃ 12 000 r/min 离心 2 min，弃上清，用 250 μL 的溶液Ⅰ（含 RNase 40 g/mL）充分悬浮细菌沉淀；加入 250 μL 的溶液Ⅱ轻缓翻转混合

收稿日期： 2007-04-13； **修回日期：** 2008-12-05.
作者简介： 宋智勇（1979-），男，博士；曲媛媛*（1976-），女，副教授；周集体（1956-），男，教授，博士生导师.

5 次，充分裂解菌体；加入 400 μL 4 ℃预冷的溶液Ⅲ，轻缓翻转混合 5 次，直至形成凝集块（如果形成凝胶状物质，说明细菌培养时间过长，需酌情缩短），然后室温静置 2 min；室温 12 000 r/min 离心 10 min，取上清液，加 0.7 倍体积的异丙醇，充分混匀，于室温放置 10 min；室温 12 000 r/min 离心 5 min，弃净上清. 加入 1 mL 70% 乙醇洗涤，4 ℃ 12 000 r/min 离心 5 min；自然晾干，30 μL 加热到 60 ℃的无菌超纯水溶解，取 5 μL 于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，溶液Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ成分如文献[9]所述.

1.4 引物合成、反向 PCR 及质粒测序

反向 PCR 及质粒测序委托宝生物工程（大连）有限公司完成. 所用引物如下.

反向 PCR 扩增引物：

F05：CTTTTTCCCGGGTTTACCTATTTTC

R05：ATCCAAACGTTAACATCACAGATAAAC

质粒测序引物设计如下.

P1：GTCCGGCTGATTCCTGTTTT

P2：ATTGATAGCATGAGTGGTGA

F01：GCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGC

R01：GCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGC

1.5 GenBank 序列号

质粒全长 2 306 bp，序列在 GenBank 注册，注册号为 DQ318958.

2 结果与讨论

2.1 *Rhodopseudomonas palustris* AS1.2352 质粒提取方法的改进

有关试剂用量及相关步骤作用时间的改进详见实验材料与方法. 对于菌株收获阶段的确定描述如下.

采用常规质粒提取方法，通常收获过夜培养的菌体或生长到对数中后期的菌体，此时菌量较大，当加入溶液Ⅲ（含有 SDS）后会产生凝胶状物质，密度稍小于水，离心后悬浮于 DNA 溶液之上，导致 DNA 溶液抽取困难，需反复抽取、离心，损失严重，并且影响 DNA 纯度. 该菌产生大量的生物质对 DNA 提取造成困难在类似研究中也有相关报道[10,11].

为此，在培养基中添加 SDS，培养一段时间后，培养基中也出现类似的凝胶状物质，推测是表面活性剂（SDS）与菌体产生的某种生物质所形成. 因此将菌体收获时间选择在生长对数前期，如图 1 所示，避免产生的大量生物质影响质粒提取. $OD_{660}=0.6$ 时，收集细胞，提取过程中得到的固体沉淀在离心后非常紧实，不会对 DNA 溶液造成污染. 可见，菌体的收获阶段对该菌 DNA 提取操作是非常重要的.

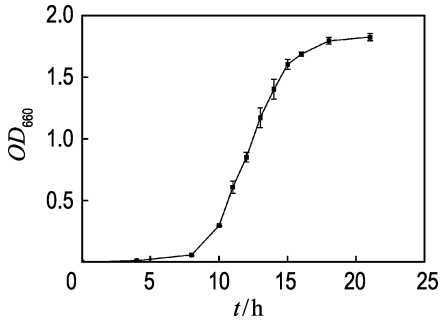


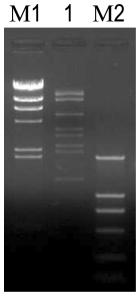
图 1 *Rhodopseudomonas palustris* AS1.2352 生长曲线（LB 培养基、30 ℃、140 r/min）

Fig. 1 The growth curve of *Rhodopseudomonas palustris* AS1.2352 (LB medium, 30 ℃, 140 r/min)

改进后的质粒提取方法，不需大量培养，减小药品消耗；无酚/氯仿抽提步骤，菌体破碎后没有凝胶状物质污染 DNA 溶液，减轻操作压力，缩短操作时间，最终提高了质粒 DNA 的纯度和浓度.

2.2 *Rhodopseudomonas palustris* AS1.2352 野生质粒的提取和鉴定

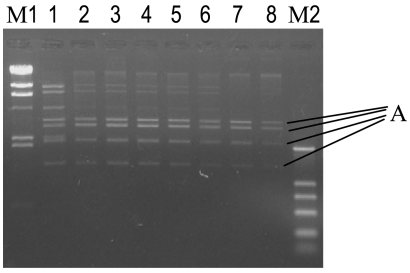
2.2.1 野生质粒的提取与回收 质粒粗提结果如图 2 所示，共有 8 条带. 为了排除染色体 DNA 碎片的可能性，进行了重复提取（如图 3 所示），对比后发现，DNA 样品放置 1 d 后，会由较亮的 4 条带增加到 8 条带，多次重复也得到类似结果，初步认为菌株中包含 4 个野生质粒.



M1：λ-*Hind* Ⅲ DNA Marker；1：质粒 DNA 样品；M2：DNA Marker DL2000

图 2 第一次质粒提取琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis analysis of plasmid extraction sample for the first time

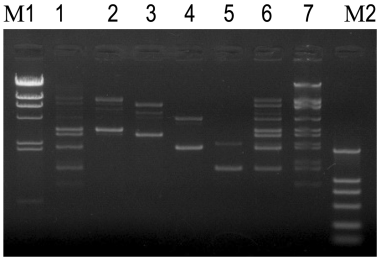


M1：λ-*Hind* Ⅲ DNA Marker；1：放置 1 d 后的质粒 DNA 样品；2～8：重复提取的质粒 DNA；M2：DNA Marker DL2000；A：推测的 4 条质粒 DNA 带

图 3　第二次质粒提取琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 3　Agarose gel electrophoresis analysis of plasmid extraction samples for the second time

为了充分证明该推测，分别将较亮的 4 条带切胶回收，并重新混合进行凝胶电泳检测（见图 4）. 由图可见，4 条带回收再混合的样品电泳图与原始 DNA 样品的带形一致，进一步证明了该菌中含有 4 个野生质粒的推测.



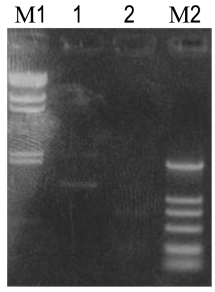
M1：λ-*Hind* Ⅲ DNA Marker；1：提取的质粒 DNA 样品对照；2：第 1 种 DNA 对照；3：第 2 种 DNA 对照；4：第 3 种 DNA 对照；5：第 4 种 DNA 对照；6：4 种回收 DNA 的混合物；7：放置 1 d 后 DNA 样品对照；M2：DNA Marker DL2000

图 4　第三次质粒提取琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 4　Agarose gel electrophoresis analysis of plasmid extraction samples for the third time

2.2.2　*反向 PCR 法验证质粒 DNA*　为了进一步证明目的 DNA 样品为质粒，即环形 DNA，采用反向 PCR 的方法进行鉴定. 通常，反向 PCR 扩增前，先用限制性内切酶酶解 DNA（目的基因中不存在该酶的酶切位点，且片段应短于 2～3 kb），然后用边接酶使带有粘性末端的靶片段自身环化，最后用一对反向引物进行 PCR，得到的线性 DNA 将含有两引物外侧的未知序列. 基于反向 PCR 的原理，即所需模板为环形 DNA 这一特性，将其用于本研究中，对目的 DNA 进行环形鉴定.

首先，将回收的最小 DNA 样品（约 2 kb）用 *Alu* Ⅰ酶切，琼脂糖凝胶电泳图如图 5 所示.

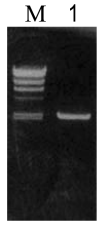


M1：λ-*Hind* Ⅲ DNA Marker；1：DNA 样品；2：*Alu* Ⅰ酶切 DNA 样品；M2：DNA Marker DL2000

图 5　约 2 kb 质粒 DNA *Alu* Ⅰ酶切结果琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 5　Agarose gel electrophoresis analysis of the 2 kb plasmid sample digested by *Alu* Ⅰ

分别回收 750 bp 和 200～400 bp 长度的 DNA 带，并克隆至 pSIMPLE-18 *Eco*RV/BAP Vector 上，再从平板上挑取阳性克隆菌落植菌后提取质粒，对该质粒（pSR1）用 M13-47、RV-M 引物进行测序. 根据测序结果设计合成一对反向 PCR 扩增引物（F05、R05）. 以回收的 DNA 样品为模板，与上述反向引物 F05/R05 进行 PCR 扩增，结果如图 6 所示.



M：λ-*Hind* Ⅲ DNA Marker；1：PCR 产物

图 6　PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 6　Agarose gel electrophoresis analysis of PCR product

将 PCR 产物回收后，用 F05、R05 对其进行测序，结果和 pSR1 质粒的序列结果一致，证明此 PCR 产物是以回收后的最小 DNA 为模板扩增得到的，同时证明该 DNA 样品为环形，即质粒，将其命名为 pRPSZY.

设计测序引物 P1、P2、F01、R01 对该产物进行测序，质粒全长 2 306 bp，如图 7 所示. 将该序列在 NCBI 中进行 Blast 检索，结果和 *Escherichia Coli* plasmid pEC157 Rom-like protein gene 有 97.8%的同源性.

```
BASE COUNT      666a        573c        533 g       534 t
ORIGIN
   1  ccaagccagt  tacctcggtt  caaagagttg  gtagctcaga  gaaccttcga  aaaaccgccc
  61  tgcaaggcgg  ttttttcgtt  ttcagagcaa  gagattacgc  gcagaccaaa  acgatctcaa
 121  gaagatcatc  ttattaatca  gataaaatat  ttctagattt  cagtgcaatt  tatctcttca
 181  aatgtagcac  ctgaagtcag  ccccatacga  tataagttgt  tgacaggatt  aaccaaaaac
 241  ttgagaacct  caccagaagg  accaaagaat  gtcatctttg  tcgtttcccc  attcgtctct
 301  ccattcttat  attcgaatga  tttaccatca  agaaaagctg  cattaggtga  aagcattatc
 361  tttaaatctc  gtccttcaca  ctgataatgg  aattgttgtg  caaatgaact  tgcagaaaga
 421  agaagcagcg  aacaaaaaag  tatctttttc  atatcagtcc  tttacattta  aaaaatcact
 481  caccactcat  gctatcaata  gatttcttaa  cctctccagc  cctctcgact  aaagcatgat
 541  ttctcttcag  cataaatgta  tagccgatcc  gactaattgg  attcattgcg  ttgtatgtat
 601  atgcaacctc  aaataaagat  actcctcgct  gattttgctc  agatccaatc  caagcaccat
 661  agccaaccaa  cagcaaaaaa  acgacgataa  cagtaatgca  gatttttttt  atcattccct
 721  atccagataa  tatgaagaaa  acagaattga  acataacatc  cgttgcccgc  accgcctcag
 781  aggctctcag  ggcgtttctg  aggcctccgg  cctgaaacat  acacctttct  gtgcccatat
 841  cgagaaaaaa  cgcccctgat  gatttctgcg  tacctgcatg  gctatgcact  caagtgaatg
 901  aagtaagatt  tcagtctgcg  atcaccataa  aaccgggaaa  aagccgtatg  acaaaacagg
                                                        M       T  K  Q  E
 961  aatcagccgc  actgaacatg  gcaaaattta  tccgggcgca  gtcgctgctg  ctgctcgaaa
       S  A  A     L  N  M     A  K  F  I   R  A  Q     S  L  L L   L  E  K
1021  aactcgacgt  gctcgatctt  gatgacgagg  cagccgactg  tgagcgaatg  cacgaacagg
       L  D  V     L  D  L     D  D  E  A   A  D  C     E  R  M     H  E  Q  A
1081  ctgaagcact  ttatcagaag  ctgagcgcac  gcttcggtat  acaggacggc  gaa t aaagag
       E  A  L     Y  Q  K     L  S  A  R   F  G  I     Q  D  G     E  *
1141  acgaaaagaa  cgctcactta  gacgaaaagc  gtatccaggg  caactatgta  tatccaccgt
1201  gtacatagtc  atgcctgacg  ctttcgagca  ggtcgagcat  gtaggaacga  cgagcttgat
1261  tggtatcgga  cacaatatgg  cgatacgcct  caaacataaa  agcacccgca  tcaccgcccg
1321  aacggcgaag  catagcggaa  atcatccgca  caaagagcag  acgttcatcg  gggcaaaggt
1381  tcataagttc  tcctggtgaa  aaaccaaaca  tgaagcaccc  atctattaac  gtcagctgtg
1441  aacgcttcat  tagaagaaaa  taggtaaacc  cgggaaaaag  atccaaacgt  taacatcaca
1501  gataaacaga  aacgtcgggt  cgatcgggaa  attctttccc  ggacggcgcg  gggttgggca
1561  agccgcaggc  gcgtcagtgc  ttttagcggg  tgtcggggcg  cagccctgaa  ccagtcacgt
1621  agcgctagcg  gagtgtatac  tggcttatga  tgttggcacg  ggtgcgggaa  tcagtgaagt
1681  gcttcatgtg  gcaggaggaa  aatgcagcag  cggagcgtaa  gcggaatata  tgagacagga
1741  gatattccgc  ttcctcgctc  actgactcgc  tgcgctcggt  cgttcggctg  cggcgagcgg
1801  tgcgggctta  cgaatggggc  ggaaatttcc  tggaagatgc  caggaagaaa  cttaacaggg
1861  aaacgataag  gccgcggcga  agccgttttt  ccataggctc  cgcccccctg  acaagcatca
1921  cgaaatctga  cgctcaaatc  agtggtggcg  aaacccgaca  ggactataaa  gataccaggc
1981  gtttccccct  ggcggctccc  tcgtgcgctc  tcctgttcct  gcctttcggt  ttaccggtgt
2041  cattccgctg  ttatggccgc  gtttgtctca  ttccacgcct  gacactcagt  tccgggtagg
2101  cagttcgctc  caagctggac  tgtatgcacg  aaccccccgt  tcagtccgac  cgctgcgcct
2161  tatccggtaa  ctatcgtctt  gagtccaacc  cggaaagaca  tgcaaaagca  ccactggcag
2221  cagccactgg  taattgattt  agaggagtta  gtcttgaagt  catgcgccgg  ttaaggctaa
2281  actgaaagga  caagttttgg  tgactg
```

图 7 2.3 kb 质粒全序列及编码区

Fig. 7 The complete sequence and cds of the 2.3 kb plasmid

另外,该质粒的 682 个碱基与 *E. coli* plasmid p15A fragment specifying the origin of replication 有 95%的同源性,推测第 1885～1887 碱基为复制起始点.

3 结 论

在常规碱裂解法基础上,对沼泽红假单胞菌 *Rhodopseudomonas palustris* AS1.2352 中野生质粒提取方法进行了优化,经优化的方法具有易操作、耗时少、纯度高、无需大量培养和提取等特点,所得质粒 DNA 纯度和质量均满足进一步分子操作的需要.

将反向 PCR 技术与生物信息学联合,鉴定 *Rhodopseudomonas palustris* AS1.2352 中的野生质粒,比传统的质粒丢失法更为省时、可靠和直观,可为其他种属菌株中野生质粒的鉴定提供参考.

研究表明,菌株中携带 4 个野生质粒,本文对其中 2.3 kb 的质粒进行了全序列测定,通过 Blast 检索,该序列与 *Escherichia Coli* plasmid pEC157 Rom-like protein gene 有 97.8%的同源性.其中 682

个碱基与 *E. coli* plasmid p15A fragment specifying the origin of replication 有 95%的同源性，推测第 1885～1887 碱基为复制起始点.

同时表明，该菌株中可同时存在多个质粒，关于 4 个质粒编码的功能基因及它们之间作用关系的相关研究以及其余 3 个质粒的测序工作正在进行中.

参考文献：

[1] DU C H, ZHOU J T, WANG J, *et al*. Construction of a genetically engineered microorganism for CO_2 fixation using a *Rhodopseudomonas/Escherichia coli* shuttle vector [J]. **FEMS Microbiology Letters**, 2003, **225**(1):69-73

[2] OH Y K, SEOL E H, KIM M S, *et al*. Photoproduction of hydrogen from acetate by a chemoheterotrophic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* P4 [J]. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2004, **29**(11):1115-1121

[3] KIM M K, CHOI K M, YIN C R, *et al*. Odorous swine wastewater treatment by purple non-sulfur bacteria, *Rhodopseudomonas palustris*, isolated from eutrophicated ponds [J]. **Biotechnology Letters**, 2004, **26**(10):819-822

[4] CARLOZZI P, SACCHI A. Biomass production and studies on *Rhodopseudomonas palustris* grown in an outdoor, temperature controlled, underwater tubular photobioreactor [J]. **Journal of Biotechnology**, 2001, **88**:239-249

[5] CHENG A X, JIA Z X, GUO H Y, *et al*. Triplet excitation transfer between carotenoids in the LH2 complex from photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* [J]. **Photosynthesis Research**, 2004, **82**(1):83-94

[6] MCGUIRL M A, LEE J C, LYUBOVITSKY J G, *et al*. Cloning, heterologous expression, and characterization of recombinant class II cytochromes c from *Rhodopseudomonas palustris* [J]. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 2003, **1619**(1):23-28

[7] MUKHOPADHYAY M, PATRA A, PAUL A. Production of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Rhodopseudomonas palustris* SP5212 [J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2005, **21**(5):765-769

[8] 潘耀谦，金春彬. 聚合酶链反应(PCR) 技术体系研究进展 [J]. 动物医学进展，1999，**20**(4):11-17

[9] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** [M]. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

[10] 孙克非，郑　平，钱新民，等. 沼泽红假单胞菌染色体的提取[J]. 生物技术，2000，**10**(3):47-48

[11] 沈　薇，杨树林，宁长发，等. 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)BS-03 的诱变育种及产鼠李糖脂类生物表面活性剂的摇瓶工艺初探[J]. 食品与发酵工业，2004，**30**(12):26-31

Identification of native plasmid in a *Rhodopseudomonas palustris* strain by reverse PCR

SONG Zhi-yong, QU Yuan-yuan*, ZHOU Ji-ti

(School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: In order to study *Rhodopseudomonas palustris* in detail, the plasmid extraction of *Rhodopseudomonas palustris* AS1.2352 was optimized, which was easier and took shorter time, and the quality and quantity of the extracted DNA sample were enough for the further molecular procedures. The native plasmids of this strain were identified by reverse PCR combined with bioinformatics. This method is easier and more reliable than traditional ones. There are four native plasmids in this strain, one of which is 2.3 kb in length and shares 97.8% homology with *Escherichia coli* plasmid pEC157 Rom-like protein gene, and base 1885-1887 is the origin of replication.

Key words: reverse PCR; native plasmid; *Rhodopseudomonas palustris*; plasmid extraction