

# 两种消除 *Klebsiella pneumoniae* 重组型质粒的方法

王 熙 萨 娜 杨建国 田平芳\*

(北京化工大学 北京市生物加工过程重点实验室, 北京 100029)

**摘 要:** 对于工业发酵菌种肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*), 研究发现有两种消除其重组型质粒的有效方法, 一种是连续传代培养, 另一种是使用消除剂十二烷基硫酸钠(SDS)。对 *K. pneumoniae* 重组菌连续 20 代传代培养后, 发现其质粒具有较高的消除率; 而以 0.2% SDS 复合  $\text{Ca}^{2+}$  处理 *K. pneumoniae* 重组菌, 也能有效消除其重组型质粒, 且该方法省却了反复的传代培养, 能快速得到质粒消除菌, 更具简便易操作性。消除了质粒的 *K. pneumoniae* 能再次接纳新的质粒, 有效避免了因质粒不相容性带来的转化不成功, 进而可用作宿主菌积累更多的生理性状。

**关键词:** 质粒; 消除; 肺炎克雷伯氏菌; 重组

**中图分类号:** Q933

## 引 言

生理工程是新兴的工业生物技术研究方向, 强调微生物的生理特性对发酵生产的重要作用<sup>[1]</sup>。工业生物技术一直致力于打造具有最优性能的细胞工厂。细胞工厂作为一个运营实体<sup>[2]</sup>, 其“内部建筑物”的“建造”过程具有时序性与累积性<sup>[3]</sup>。因此, 一个优良工业发酵菌株的性能是逐渐累积得来的。质粒作为携带异源基因的主要工具, 其存在与否会对宿主细胞的生理状态造成较大的影响。所以, 重组质粒的导入、消除与再导入将成为生理工程研究中一项常规实验操作。

质粒消除并非一个新的概念, 临床上用于解决细菌耐药性蔓延的研究已逾 20 年<sup>[4]</sup>。由于不同微生物生理与结构上的差异, 质粒消除的方法各不相同<sup>[5]</sup>, 且多集中于内生型质粒的研究。肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)具有良好的工业生产潜能, 已被广泛用于研究重组菌发酵生产 1,3-丙二醇等重要化工原料。

本文结合生理工程的研究意义, 介绍两种针对工业发酵菌种 *K. pneumoniae* 重组型质粒的有效消除方法, 为遗传改造 *K. pneumoniae* 以积累优良生理

性状提供研究方法。

## 1 实验部分

### 1.1 材料

重组菌株 *K. pneumoniae* Kp5-3 (含重组质粒 pET-dhaT-Kan<sup>r</sup>, ~6.4 kb), Kp0901、Kp0902 (含重组质粒 pET-ald4-Kan<sup>r</sup>, ~7.0 kb), 本实验室保存。质粒 pET-AB-Kan<sup>r</sup>, ~9.4 kb, 本实验室保存。LB 培养基<sup>[6]</sup>, *K. pneumoniae* 基本培养基<sup>[7]</sup>; 十二烷基硫酸钠(SDS), Solarbio 公司; 硫酸卡那霉素(Kan), 北京欣京科公司; 质粒小量快速提取试剂盒, 北京博迈德公司。

琼脂糖凝胶电泳仪、电转化仪, 美国 Bio-Rad 公司。FluorChem<sup>TM</sup> 5500 凝胶成像系统, 美国安莱公司。

### 1.2 连续传代法

将菌株接种在无 Kan 的 *K. pneumoniae* 液体基本培养基中, 37℃ 振荡培养, 每 12 h 传代 1 次, 连续传数代。菌液经稀释  $10^5$  倍后涂布在 LB 平板上, 37℃ 静置培养 12 h。随机挑取 50 个菌落, 用无菌牙签分别影印至不含 Kan 与含有 Kan 的 LB 平板上 (Kan 工作质量浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 37℃ 静置培养 12 h, 记菌落数。

### 1.3 SDS 法

将菌株接种在含 0.2% SDS 与  $\text{Ca}^{2+}$  的 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养 12 h, 菌液经稀释  $10^5$  倍后涂布在 LB 平板上, 37℃ 静置培养 12 h。将单菌落

收稿日期: 2010-03-29

基金项目: 国家自然科学基金(20876009)

第一作者: 男, 1984 年生, 硕士生

\* 通讯联系人

E-mail: tianpf@mail.buct.edu.cn

用无菌牙签分别影印至不含 Kan 与含有 Kan 的 LB 平板上(Kan 的质量浓度为 50 μg/mL),37℃ 静置培养 12 h。

2 结果与讨论

异源基因的导入会令宿主菌产生复杂的生理效应<sup>[8]</sup>。对于工业生产菌株而言,为获得具有优良性能的生产菌株,通常要对宿主菌进行诱变与遗传修饰,因此获得的菌株较出发菌具有不同的生理特性,适应性进化得到了累积。如果排除该菌内原有的质粒,将可用作新的基因工程宿主菌,以便再导入新的质粒或对其进行新的遗传修饰,进而逐步获得更多的优良性状。

2.1 连续传代培养对质粒消除的影响

由于重组质粒随宿主细胞的分裂而随机分配到子细胞,因此具有分配不稳定性,可产生无质粒的子代细胞<sup>[9]</sup>。利用质粒的这一遗传不稳定性可对重组菌进行质粒消除。为实现重组质粒的消除,对实验室构建的重组菌 K0901 在发酵条件下连续 20 代传代培养,考察连续传代培养对质粒消除的影响。表 1 显示重组菌的质粒消除率约为 96%,可用于消除 *K. pneumoniae* 重组菌的质粒。

表 1 传代培养对质粒消除的影响  
Table 1 Effect of subculturing on plasmid elimination

菌株	对照平板菌落数/个	Kan 平板菌落数/个
出发菌株 K0901	50	48
K0901 连续传 20 代	50	2

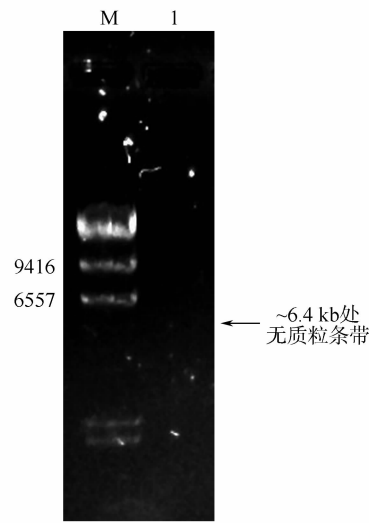
然而,反复传代耗时长,增加了污染几率,使菌株生理特性发生适应性改变;此外,由于细胞群体存在环境依赖性水平基因转移,无质粒细胞与有质粒细胞之间存在既相互竞争又相互共存的生存关系<sup>[10]</sup>。因此,连续传代培养方法是随机性较大的质粒消除方法。

2.2 SDS 法消除重组质粒

采用适当方法干扰质粒的复制或者降低质粒的稳定性是临床上消除细菌耐药质粒的常规策略。据报道,SDS 是 *K. pneumoniae* 内生型质粒的有效消除剂<sup>[11]</sup>。SDS 通过改变质粒在细胞膜上的结合位点而干扰其复制,进而导致其不稳定性分配,达到消除质粒的目的。

实验室保存菌 Kp5-3 是敲除乳酸脱氢酶基因并经诱变的重组菌,含有重组质粒 pET-dhaT-Kan<sup>r</sup>,具

有较好的发酵性能。为消除其中的质粒,将 Kp5-3 用 0.2% SDS 复合 Ca<sup>2+</sup> 处理,通过平板筛选,随机挑取失去 Kan 抗性的菌落,进一步提取其质粒酶切鉴定,在 ~6.4 kb 处已不显示原有质粒条带,表明质粒消除成功,将获得的不含质粒 pET-dhaT-Kan<sup>r</sup> 的菌株命名为 Kp5-3-E(图 1)。



M—DNA Marker (λ-DNA/Hind III); 1—Kp5-3-E  
图 1 提取质粒鉴定质粒消除的结果  
Fig. 1 Identification of plasmid elimination

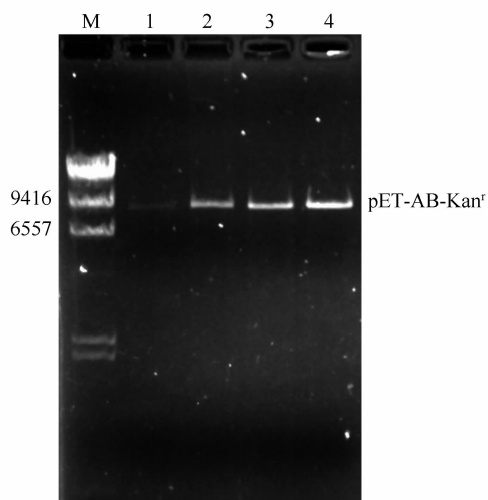
实验中发现,SDS 方法能够有效消除 *K. pneumoniae* 的重组型质粒,消除效率因菌株与内含的质粒而异,对于 Kp5-3 菌株,消除率约为 30%,而对于 K0901 菌株则不足 10%。尽管 SDS 方法的质粒消除率不高,但省却了反复的传代培养,能够快速得到质粒消除菌,且操作简便,实际消除效果已足够满足实验需要。

2.3 质粒消除菌重新导入新质粒

为考察质粒消除菌 Kp5-3-E 能否接受其他重组质粒,进一步转化质粒 pET-AB-Kan<sup>r</sup> 至该新宿主菌,从 Kan 平板上随机挑取 4 株阳性克隆菌株,经质粒提取、酶切后电泳结果显示,阳性克隆包含大小为 ~9.4 kb 的质粒 pET-AB-Kan<sup>r</sup>,表明该质粒已被成功转化(图 2),质粒的转化效率与正常电转化效率相当,经发酵培养显示,该质粒的稳定性可满足常规的发酵培养。

相反,由于质粒的不相容性,未经质粒消除的菌株 Kp5-3 转化质粒 pET-AB-Kan<sup>r</sup> 后,经质粒提取、酶切、电泳鉴定仍为原质粒 pET-dhaT-Kan<sup>r</sup> (~6.4 kb)(图 3)。结果表明,消除了质粒的菌株能够再次接纳新的质粒,从而有效避免了因质粒不相容性而带

来的转化失败。

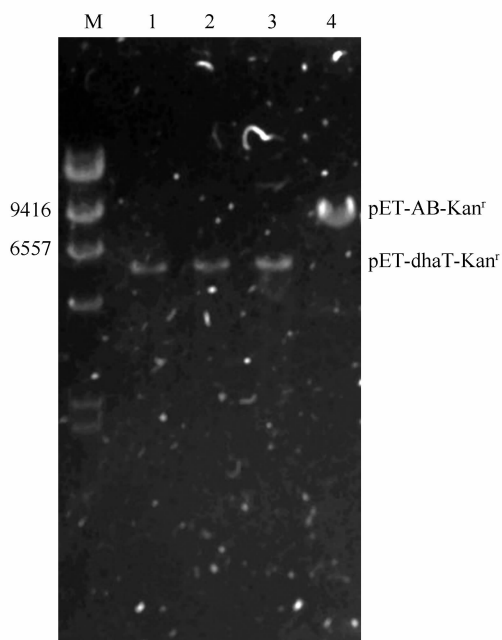


M—DNA Marker ( $\lambda$ -DNA/*Hind* III);

1~4—再导入质粒 pET-AB-Kan<sup>r</sup> (~9.4 kb)

图2 重组质粒 pET-AB-Kan<sup>r</sup> 转化质粒消除菌 Kp5-3-E

Fig.2 Transformation of plasmid pET-AB-Kan<sup>r</sup> to Kp5-3-E

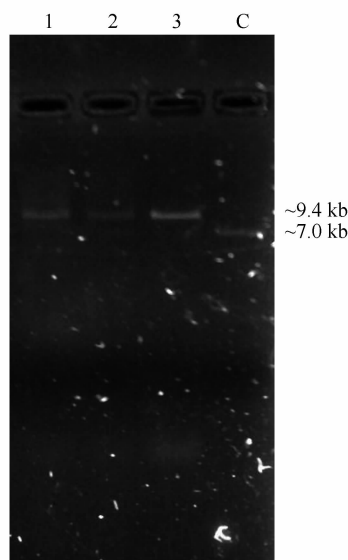


M—DNA Marker( $\lambda$ -DNA/*Hind* III); 1~3—质粒 pET-dhaT-Kan<sup>r</sup> (~6.4 kb); 4—对照质粒 pET-AB-Kan<sup>r</sup> (~9.4 kb)

图3 重组质粒 pET-AB-Kan<sup>r</sup> 转化未经质粒消除菌 Kp5-3

Fig.3 Transformation of plasmid pET-AB-Kan<sup>r</sup> to Kp5-3

此外,利用 SDS 法又成功消除了另一株菌株 Kp0902 的重组质粒 pET-ald4-Kan<sup>r</sup>,转化新质粒 pET-AB-Kan<sup>r</sup> 至质粒消除菌株,从 Kan 平板上随机挑取 3 株阳性克隆菌株,经质粒提取、酶切后电泳结果显示新质粒转化成功(图4)。



C—对照质粒 pET-ald4-Kan<sup>r</sup> (~7.0 kb); 1~3—再导入质粒 pET-AB-Kan<sup>r</sup> (~9.4 kb)

图4 重组质粒 pET-AB-Kan<sup>r</sup> 转化质粒消除菌 Kp0902

Fig.4 Transformation of plasmid pET-AB-Kan<sup>r</sup> to Kp0902

### 3 结论

建立了消除 *K. pneumoniae* 重组型质粒的两种方法,连续传代法与 SDS 法。用 0.2% SDS 复合 Ca<sup>2+</sup> 处理 *K. pneumoniae*,能有效消除其重组型质粒,获得的质粒消除菌可再次导入新的质粒,能避免因质粒不相容性带来的转化失败。与连续传代培养方法相比,该方法更具简便易操作性。

### 参考文献:

- [1] Zhang Y P, Zhu Y, Zhu Y, et al. The importance of engineering physiological functionality into microbes [J]. Trends in Biotechnology, 2009, 27(12): 664-672.
  - [2] Purnick P E M, Weiss R. The second wave of synthetic biology: from modules to systems [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009, 10(6): 410-422.
  - [3] Tracewell C A, Arnold F H. Directed enzyme evolution: climbing fitness peaks one amino acid at a time [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2009, 13(1): 3-9.
  - [4] Amábile-Cuevas C F, Heinemann J A. Shooting the messenger of antibiotic resistance: plasmid elimination as a potential counter-evolutionary tactic [J]. Drug Discovery Today. 2004, 9(11): 465-467.
  - [5] 娄恺,班睿,赵学明. 细菌质粒的消除 [J]. 微生物学通报, 2002, 29(5): 99-103.
- Lou K, Ban R, Zhao X M. Plasmid curing in bacteria

- [J]. Microbiology, 2002, 29(5): 99–103. (in Chinese)
- [6] Sambrook J, Russel D W. Molecular Cloning: A laboratory manual: Volume 1[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [7] 曲荟锦, 王凤寰, 田平芳, 等. 克雷伯肺炎杆菌 1, 3-丙二醇氧化还原酶基因克隆及表达条件研究[J]. 工业微生物, 2007, 37(1): 25–29.
- Qu H J, Wang F H, Tian P F, et al. Cloning of 1, 3-propanediol oxidoreductase gene from *Klebsiella pneumoniae* and preliminary study on its expression conditions [J]. Industrial Microbiology, 2007, 37(1): 25–29. (in Chinese)
- [8] 史悦, 于慧敏, 田卓玲, 等. 产腈水合酶重组大肠杆菌的质粒稳定性研究[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(8): 70–75.
- Shi Y, Yu H M, Tian Z L, et al. Study on plasmid stability of a recombinant *Escherichia coli* producing nitrile hydratase[J]. China Biotechnology, 2005, 25(8): 70–75. (in Chinese)
- [9] Kachroo A H, Jayaram M, Rowley P A. Metabolic engineering without plasmids [J]. Nature Biotechnology, 2009, 27(8): 729–731.
- [10] Ellis R J, Lilley A K, Lacey S J, et al. Frequency-dependent advantages of plasmid carriage by *Pseudomonas* in homogeneous and spatially structured environments [J]. The ISME Journal, 2007, 1(1): 92–95.
- [11] El-Mansi M, Anderson K J, Inche C A, et al. Isolation and curing of the *Klebsiella pneumoniae* large indigenous plasmid using sodium dodecyl sulphate[J]. Research in Microbiology, 2000, 151(3): 201–208.

## Two methods for eliminating recombinant plasmids in *Klebsiella pneumoniae*

WANG Xi SA Na YANG JianGuo TIAN PingFang

(Beijing Key Lab of Bioprocess, Beijing University of Chemical Technology Beijing, 100029, China)

**Abstract:** Good physiological performance of industrial microbes is crucial for successful bioprocessing. This generally requires the elimination of plasmids. In order to eliminate the recombinant plasmids in *Klebsiella pneumoniae*, two methods have been investigated, namely subculturing and sodium dodecyl sulphate (SDS) treatment. After 20 generations of subculturing, recombinant *K. pneumoniae* showed a high plasmid elimination ratio, and the recombinant strain treated by 0.2% SDS coupled with  $\text{Ca}^{2+}$  also showed a high plasmid elimination ratio. After these treatments, the resulting plasmid-free strain was capable of uptaking new plasmids, which allows the host strain to accumulate other desirable physiological traits.

**Key words:** plasmid; elimination; *Klebsiella pneumoniae*; recombinant