

青岛农业大学

毕业论文(设计)

题 目： 假单胞菌 LY1 中吡啶乙酸
降解基因的敲除

姓 名： 王永豪

学 院： 生命科学学院

专 业： 生物技术

班 级： 1403 班

学 号： 20144032

指导教师： 于浩

2018 年 6 月 10 日

青岛农业大学

毕业论文（设计）诚信声明

本人郑重声明：所呈交的本科毕业论文（设计）是本人在指导老师的指导下，进行研究工作所取得的成果，成果不存在知识产权争议。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体在文中均作了明确的说明并表示了谢意。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

毕业论文（设计）作者签名：

年 月 日

目录

中文摘要.....	I
Abstract.....	II
引言.....	1
1 材料与amp;方法.....	2
1.1 实验材料.....	2
1.1.1 化学试剂.....	2
1.1.2 生化试剂和试剂盒.....	2
1.1.3 实验器皿及用具.....	2
1.1.4 主要试验仪器.....	2
1.1.5 培养基及缓冲液.....	2
1.1.6 菌种.....	3
1.2 菌株 LY1 抗性实验研究.....	3
1.3 <i>iadA</i> 、 <i>iadC</i> 基因的敲除.....	4
1.3.1 提基因组.....	4
1.3.2 同源臂扩增.....	4
1.3.3 质粒酶切.....	5
1.3.4 重组质粒.....	5
1.3.5 转化 Trans-T1 及验证.....	6
1.3.6 转化 S17-1 及验证.....	7
1.4 双亲杂交.....	7
1.4.1 单交换突变株的构建.....	8
1.4.2 双交换突变株的构建.....	9
1.4.3 双交换突变株的验证.....	10
1.4.4 双交换突变株的功能验证.....	10
2 结果与分析.....	11
2.1 <i>iadA</i> 和 <i>iadC</i> 基因的定向插入失活.....	11
2.1.1 载体构建.....	11
2.1.2 转化.....	12
2.1.3 单交换突变株的构建.....	13
2.1.4 双交换突变株的构建.....	14
2.2 双交换突变株的功能验证.....	15
3 讨论.....	17
参考文献:	18
致谢.....	19

假单胞菌 LY1 中吲哚乙酸降解基因的敲除

生物技术专业 王永豪

指导教师 于浩

摘要：吲哚乙酸，又称为植物生长素，是自然界中分布最广泛的吲哚类化合物，吲哚乙酸是研究吲哚类化合物微生物代谢的模式化合物。假单胞菌 LY1 是本实验室分离得到的一株高效吲哚乙酸降解菌株，本研究通过对菌株 LY1 基因组序列的生物信息学比对找到了可能和吲哚乙酸降解有关的基因簇，并对使用 pK18mobsacBtet 质粒作为基因敲除的工具质粒，通过双亲杂交的方法对基因簇上面的 *iadA*、*iadC* 进行定向插入失活。获得 LY1 *iadA*::pK18mobsacBtet 突变株和 LY1 *iadC*::pK18mobsacBtet 突变株。结果表明两株突变株均无法代谢吲哚乙酸，由此可以确定这两个基因是菌株 LY1 代谢吲哚乙酸的关键基因，本研究为吲哚类化合物的降解提供一定的理论依据。

关键字：假单胞菌 LY1；吲哚乙酸降解；插入失活；双亲杂交

Deletion of Indoleacetic Acid Degrading Gene from *Pseudomonas* LY1

Student majoring in Biotechnology Wang Yonghao

Tutor Yu Hao

Abstract: Indoleacetic acid, known as auximone, is most widely distributed pyridinic compound, which is the typical compound for the study of pyridinic compound degradation. *Pseudomonas* LY1 strain isolated from soil is an efficient indoleacetic acid degrader. A gene clusters that may be involved in the degradation of indole acetic acid were found by sequence alignment through genome of strain LY1. Two genes *iadA* and *iadC* in this gene cluster may play important role in the degradation of indoleacetic acid. In this study, gene knockouts were performed for these two genes, and the functions of the genes were estimated by observing the functional changes of the mutants. pK18mobsacBtet plasmid was used as a gene knockout tool plasmid, and LY1 was directed to be inserted and inactivated by a parental hybrid method, thereby obtaining a LY1 *iadA*::pK18mobsacBtet mutant and a LY1 *iadC*::pK18mobsacBtet mutant. Through the verification of the physiological function of the mutant strains, it was determined that these two genes are the key genes for the metabolism of indoleacetic acid in strain LY1. This study provides a theoretical basis for the degradation of indoleacetic acid.

Key words: Wild type strain LY1; Suicide plasmid; Insertion inactivation; Parental hybridization;

引言

近几年来,随着工业的快速发展,产生了大量的有机污染物,这些污染物大多无法使用传统的方法进行清除,所以,利用高效的生物技术降解污染物成了研究的热点^[1]。研究表明,利用微生物降解污染物不仅高效,而且绿色环保。

吡啶是焦化废水中一种典型的难降解有机污染物,它同时与焦化废水中酚类物质、氨氮、芳香族有机物、杂环及多环化合物共存^[2]。大量的吡啶及其衍生物通过工业废水、焦化废水、精炼厂废水和香烟烟雾等途径排入自然环境中^[3]。由于吡啶类化合物具有很高的生物学活性,通常具有致癌、致突变等特性,对微生物和动物具有极高的毒性^[4]。另外,吡啶类化合物一般具有半衰期较长,降解困难、易溶于水等特点,因此环境中过量的吡啶类化合物对大多生物的生活造成了严重威胁,因此去除环境中的吡啶类污染物十分必要^[5]。但同时其衍生物也是一类非常重要的含氮杂环化合物。已经被广泛的用于医药制剂,农药,染料工业和材料化学等领域,具有重要的应用价值和研究价值^[6]。

吡啶乙酸是一种重要的吡啶衍生物,适宜浓度的吡啶乙酸是土壤保持活力的重要因素^[7]。微生物代谢吡啶乙酸在微生物与植物互作中起到了重要的作用,所以对微生物降解吡啶乙酸的研究十分有必要,但是该方向的研究长期被忽视^[8]。

研究基因的功能常用的方法是插入失活,它能够为确定某一基因的功能提供最直接的证据^[9]。插入失活的原理是将不能自主复制的自杀性质粒转入宿主细胞中,与宿主基因进行重组,达到对特定片段基因失活的目的,进而开展该基因功能的研究实验^[10]。常用的插入失活的方法有两种,一种是随机插入失活,一种是定点基因插入失活^[11]。定点插入失活是利用酶切过后的自杀质粒与 PCR 扩增出的特定目的片段进行连接,构建出携带有特定基因片段的重组质粒,再通过转化和双亲杂交等实验来完成定向插入失活系统的建立^[12]。

实验室在前期实验中从土壤中筛选到一株能够高效降解吡啶乙酸的假单胞菌属菌株 LY1,本次实验就是对该基因簇上面预测的两段功能基因利用同源重组方法构建重组质粒,通过双亲杂交筛选突变体的方法对特定基因进行敲除^[13]。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 化学试剂

吡啶乙酸、吡啶、四环素、氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉素。

1.1.2 生化试剂和试剂盒

2×Taq 酶、2×Pfu 酶、超纯水、5× loading buffer、DL10,000 DNA Maker、dNTP、核酸染液，柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒，柱式细菌质粒 DNA 抽提试剂盒，柱式 DNA 胶回收试剂盒（上海生工生物工程股份有限公司）。

1.1.3 实验器皿及用具

250 mL 锥形瓶、1.5 mL 离心管、0.2 mL 离心管、移液枪、无菌枪头、接种环、涂布棒、培养皿。

1.1.4 主要试验仪器

本次实验所用到的主要仪器如表 1

表 1 实验仪器设备

仪器名称	仪器型号	仪器厂家
高速微量离心机	E3115	安胜科技有限公司
双层全温摇床	QYC 2112	上海福玛实验设备有限公司
超净工作台	SW-CJ-2FD	苏州净化设备有限公司
PCR 仪	T100	BIO-RAD
微生物恒温培养箱	YHP-9162	姚氏仪器设备厂（Shanghai）

1.1.5 培养基及缓冲液

1) LB 培养基

表 2 LB 培养基配方

药品	质量（g/L）
胰蛋白胨	10.0
酵母浸粉	5.0
氯化钠	10.0
琼脂粉	20.0

将以上药品按照表 2 所列方法配置好后使用高压蒸汽灭菌锅 120℃灭菌 20 min。

2) 蔗糖培养基

表 3 蔗糖培养基配方

药品	质量 (g/L)
胰蛋白胨	10.0
酵母浸粉	5.0
氯化钠	10.0
蔗糖	100.0
琼脂粉	20.0

3) IAA 培养基

本次试验所使用的 IAA 培养基是以 IAA 为唯一碳源和氮源的无机盐培养基 (IAA-MSM)。控制 IAA 为唯一营养能够控制单一变量, 从而更有利于突变株的筛选。IAA 液体培养基配方如下:

表 4 IAA 培养基配方

药品	质量 (mL/L)
MSM 缓冲液(20×)	50
Mg ²⁺ 溶液 (2,000×)	0.5
无机盐溶液(2,000×)	0.5
IAA	0.5g

将以上药品按照表 3 所列方法配置好后加入氢氧化钠溶液调节培养基 pH 为 7.0 后使用高压蒸汽灭菌锅 120℃灭菌 20 min。

1.1.6 菌种

假单胞菌属菌株 LY1, *Escherichia coli* S17-1, *Escherichia coli* Trans1-T1

1.2 菌株 LY1 抗性实验研究

前期实验中从土壤中筛选出一株能够降解吲哚乙酸的假单胞菌属菌株 LY1, 实验前期需要对筛选出的假单胞菌属菌株 LY1 进行抗性验证以检测 LY1 菌株在不同抗性中以 IAA 作为唯一碳氮源时的生长情况。

配置 5 瓶 50 mL 的 IAA 培养基, 灭菌后分别加入氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉素、四环素以及空白, 抗生素终浓度为 50 µg/mL 每瓶接入 1 mL 的 LY1 菌种, 放在 30℃双层全温摇床培养观察生长情况并记录。

1.3 *iadA*、*iadC* 基因的敲除

本实验中对假单胞菌属 LY1 基因簇上的特定基因进行基因 (*iadA*、*iadC*) 敲除, 实验技术路线概述为: 构建转化载体、筛选单交换突变株、筛选双交换突变株。

1.3.1 提基因组

在后续同源臂扩增实验过程中需要使用假单胞菌属菌株 LY1 菌株的基因组作为模板, 将假单胞菌属菌株 LY1 菌株转接进 LB 培养基 (氨苄抗性), 在 30°C 双层恒温震荡培养箱中 120 r/min 过夜培养, 使用柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒按照说明书上的步骤提取 LY1 的基因组用作后续实验模板。

1.3.2 同源臂扩增

在本实验中, 首先分别将 *iadA*、*iadC* 基因的同源臂 A 和同源臂 B 进行 PCR 扩增, 胶回收纯化 PCR 产物后, 将同源臂 A 和同源臂 B 连接到载体上构成全新重组质粒。

引物设计: 在进行构建转化载体时, 首先要根据已知的 *iadA* 和 *iadC* 基因序列设计引物。在设计引物时应遵循引物的设计基本原则, 控制 Tm 值相近, 引物间不要形成二聚体, 同时要保证引物 GC 含量在 60%左右且不能太长。按照这几项基本原则设计出本次载体构建所使用引物如表 5:

表 5 双同源臂扩增引物

名称	序列 (5'-3')
<i>iadA</i> -LF	CGCCAACGGCGTGTTGAGCGTCGAGCAG
<i>iadA</i> -LR	CGGGTACCGAGCTCGAATTTGGTCATCCTCGACACGG
<i>iadA</i> -UF	TATGACATGATTACGAATTAGGCGGCGGATTTCGCACAG
<i>iadA</i> -UR	CGCTCACCACGCCGTTGGCGTACACCTT
<i>iadC</i> -LF	ACAAGGGCGAGTCGGCGGTTTCGGGCTTCAA
<i>iadC</i> -LR	CGGGTACCGAGCTCGAATTCTTGCGCTGGATCTTGAA
<i>iadC</i> -UF	TATGACATGATTACGAATTGCCAGCGGCAGTTGGGTGA
<i>iadC</i> -UR	AACCGCCGACTCGCCCTTGTCCAGGCAGTC

假单胞菌属菌株 LY1 基因组作为 PCR 的模板, 用表 4 的对应引物分别扩增两个基因的两端同源臂 A 和同源臂 B, 共四个片段, 根据柱式 DNA 胶回收试剂盒说明书要求进行胶回收操作, PCR 扩增体系如表 6, PCR 扩增循环程序如表 7。

表 6 双同源臂扩增体系

试剂	加入量 (μL)
Primer1	2.0
Primer2	2.0
LY1 基因组	1.0
2×Mix	30.0
水	25.0
Total	60.0

表 7 双同源臂扩增程序

程序/温度 (°C)	时间 (s)
1 95	300
2 95	30
3 58	30
4 72	105
5 72	300
6 12	∞

} 34 个循环

1.3.3 质粒酶切

本实验使用 pK18mobsacBtet 质粒进行酶切作为连接载体，使用 EcoRI 酶对 pK18mobsacBtet 质粒进行单酶切处理，酶切体系如表 8

表 8 质粒单酶切体系

名称	加入量 (μL)
pK18mobsacBtet 质粒	42.5
EcoRI 酶	2.5
10×buffer	5.0
Total	50.0

质粒酶切之后根据柱式 DNA 胶回收试剂盒说明书要求进行胶回收操作。

1.3.4 重组质粒

重组质粒实验用一步克隆连接的方法进行质粒载体与同源臂 A 和同源臂 B 的连接，用之前胶回收的对应同源臂 A 和同源臂 B 与切开的 pK18mobsacBtet 质粒进行一步克隆连接，50℃水浴反应连接 30 分钟。连接体系如表 9

表 9 同源臂与质粒连接体系

名称	加入量 (μL)
同源臂 A	2.0
同源臂 B	2.0
pK18MST	1.0
2×SoSoo Mix	5.0
Total	10.0

1.3.5 转化 Trans-T1 及验证

将重组质粒按照 Trans-T1 感受态说明书进行转化操作，最后涂布在含四环素抗性的 LB 板上，于 37°C 倒置培养 24 h。

24 h 后板上长起菌落，准备好含有四环素抗性的 LB 培养基平板，用牙签或者接种环将长起来的单菌落进行短棒划线来扩大培养，一个平板划大约 15 个左右，于 37°C 倒置培养 24 h。

待短棒划线的菌长起来后进行菌液 PCR 实验，水煮法制作模板。准备 0.2 mL 的离心管，每管加入 15 μL 的超纯水，在超净工作台内用枪头刮取一部分菌在超纯水中晃动几下，将离心管沸水煮 5 分钟，再 12,000 rpm 离心 3 分钟，上清液用作 PCR 的模板，用同源臂 A 的上游引物和同源臂 B 的下游引物对其进行 PCR 特异性扩增，PCR 扩增体系如表 10，PCR 扩增循环程序如表 11

表 10 PCR 扩增体系

试剂	加入量 (μL)
Primer1	0.6
Primer2	0.6
DNA	1.0
金牌 Mix	10.0
Total	12.2

表 11 PCR 扩增程序

程序/温度 (°C)	时间 (s)
1 98	180
2 98	20
3 61	20
4 72	25
5 72	300
6 12	∞

}34 个循环

跑电泳验证片段大小,将正确大小的片段对应的菌落转接进含有四环素抗性的 LB 液体培养基中,37°C振荡培养 24 h,长起来后先保菌,然后根据柱式细菌质粒 DNA 抽提试剂盒说明书进行提质粒操作,将得到的质粒进行再一次的 PCR 验证,引物、体系和程序与上一步的菌液 PCR 相同。

1.3.6 转化 S17-1 及验证

将提出来的质粒转化进 S17-1 感受态中,最后涂布在含四环素抗性的 LB 板上,于 37°C倒置培养 24 h。

24 h 后板上长起菌落,准备好含有四环素抗性的 LB 培养基平板,用牙签或者接种环将长起来的单菌落进行短棒划线来扩大培养,一个平板划大约 15 个左右,于 37°C倒置培养 24 h。

待牙签划线的菌长起来后进行菌落 PCR 实验,准备 0.2 mL 的离心管,每管加入 15 μ L 的超纯水,在超净工作台内用枪头刮取一部分菌在超纯水中晃动几下,将离心管沸水煮 5min,再 12,000 rpm 离心 3 分钟,上清液用作 PCR 的模板,用同源臂 A 的上游引物和同源臂 B 的下游引物对其进行 PCR 特异性扩增,体系和程序与转化 Trans1-T1 时相同。

PCR 后跑电泳验证片段大小,将正确大小的片段对应的菌落转接进含有四环素抗性的 LB 液体培养基中,37°C振荡培养,同时将假单胞菌属 LY1 菌株转接进含有卡那霉素抗性的 LB 培养基中,保证与 S17-1 培养时间相同,准备做双亲杂交实验。

1.4 双亲杂交

将培养好的假单胞菌属 LY1、S17-1 (pK18mobsacBtet-*iadA*) 和 S17-1 (pK18mobsacBtet-*iadC*) 测量 OD600,尽量使假单胞菌属菌株和 S17-1 突变株的生长状况相同,确保共培养阶段使用的两种菌株是处于相同生长阶段的。

在超净工作台内用移液枪分别吸取 300 μL 的假单胞菌属 LY1 菌株的菌液和 600 μL 的 S17-1 突变株的菌液，将两种菌液混合在一个无菌的 1.5 mL 的离心管中，于离心机里 6,000 rpm 离心 1 分钟，用移液枪小心吸取上清液弃掉，保留菌体。用移液枪吸取 900 μL 的无菌水将沉淀彻底吹打悬浮起来，6,000 rpm 离心 1 分钟，弃掉上清液，再次用 900 μL 的无菌水将沉淀彻底吹打悬浮起来，6,000 rpm 离心 1 分钟，这样连续两次用无菌水冲洗是为了将 S17-1 突变株带有的原培养基里的抗生素成分洗掉，保留菌体。在超净工作台中用移液枪吸取 900 μL 灭过菌的 1 mol/L 的 MgSO_4 将菌体沉淀彻底吹打悬浮起来，用无菌的 1 mL 一次性注射器吸取悬浮起来的液体，将其缓缓打到无菌滤膜上，是菌液均匀的散布在整个滤膜上，用镊子小心夹起铝膜平铺到不含任何抗性的 LB 平板的正中央。将平板标记好后放到 30°C 的恒温培养箱中正置培养 24 h。

共培养的菌株长好后，将平板放到超净工作台中，取三个无菌的 1.5 mL 离心管，每管加入 0.9 mL 的无菌水留作一会稀释菌液。打开平板，使其倾斜至 45°，用移液枪吸取 900 μL 灭过菌的 10 mmol/L 的 MgSO_4 ，反复而缓慢的将板上长好的菌体冲洗下来当做原菌液，用移液枪吸取 100 μL 的原菌液加入到之前准备好的 900 μL 无菌水中，在振荡器上混匀后，用移液枪从中吸取 100 μL 菌液加入到下一管 900 μL 无菌水中，以此类推。最后用移液枪分别从 10^{-2} 和 10^{-3} 的两管菌液中各吸取 100 μL ，涂布到既含有氨苄青霉素也含有四环素两种抗性的 LB 平板上，将涂布好的平板放到 30°C 恒温培养箱中倒置培养 24 h。

1.4.1 单交换突变株的构建

将长好的双抗板放到超净工作台中，准备好既含有氨苄青霉素也含有四环素抗性的 LB 培养基双抗平板，用牙签或者接种环将长起来的单菌落进行短棒划线来扩大培养，一个平板划大约 15 个左右，于 30°C 倒置培养 24 h。

待短棒划线的菌长起来后进行菌落 PCR 实验，水煮法制作模板。准备 0.2 mL 的离心管，每管加入 15 μL 的超纯水，在超净工作台内用枪头刮取一部分菌在超纯水中晃动几下，将离心管沸水煮 5 分钟，再 12,000 rpm 离心 3 分钟，上清液用作 PCR 的模板。用同源臂 A 的上游引物和同源臂 B 的下游引物对其进行 PCR 特异性扩增，PCR 扩增体系如表 12，PCR 扩增循环程序如表 13

表 12 PCR 扩增体系

试剂	加入量 (μL)
Primer1	0.6
Primer2	0.6
模板	0.4
2×Mix	7.5
ddH ₂ O	6.0
Total	15.0

表 13PCR 扩增程序

程序/温度 (°C)	时间 (s)
1 94	180
2 94	20
3 61	20
4 72	60
5 72	300
6 12	∞

跑电泳验证片段大小，将片段大小正确的样品所对应的菌落用 *sacB* 引物再扩一遍，体系同上，将有条带且大小正确的样品所对应的菌落分别转接到含有氨苄青霉素抗性的 LB 液体培养基中培养，长出来的菌株即单交换突变株 LY1 *iadA*::pK18mobsacBtet、LY1 *iadC*::pK18mobsacBtet。

1.4.2 双交换突变株的构建

本次实验中用 10% 的蔗糖培养基来进行双交换突变株的初步筛选。

在超净工作台中将所有单交换突变株的菌落用无菌枪头刮取一部分转接到含有氨苄抗性的 LB 液体培养基中，于 30°C 的恒温培养箱中培养 24 h。

将长好的单交换突变株放到超净工作台中，用移液枪吸取 100 μL 菌液，在无菌的 1.5 mL 离心管中用无菌水将其梯度稀释到 10^{-5} 和 10^{-6} 浓度，再分别吸取 100 μL 均匀涂布到含有氨苄青霉素抗性 10% 的蔗糖 LB 培养基上进行双交换突变株的筛选，于 30°C 恒温培养箱中倒置培养 24 h。

涂布的板长好后，进行抗性短棒划线筛选并扩大培养，在超净工作台中准备好两个板，一个是具有氨苄青霉素单抗性的 LB 板，另一个是具有氨苄青霉素和

四环素双抗性的 LB 板。用牙签或者接种环挑取一个蔗糖板上长好的单菌落，将其依次划线到氨苄青霉素和四环素双抗性的 LB 板和氨苄青霉素单抗性的 LB 板，同一单菌落分别在两个板上划的线做相同标记，将两个板都放到 30℃恒温培养箱中倒置培养 24 h。

1.4.3 双交换突变株的验证

观察单抗板和双抗板，对于同一菌落在两个班上划出的线，将双抗板上未长而氨苄青霉素单抗板上长出的菌落进行水煮法制作 PCR 的模板，用同源臂 A 上游引物和同源臂 B 下游引物作为此次 PCR 的引物，配置体系和循环程序与 1.4.1 步骤中 PCR 的相同。

琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，将有正确条带的样品所对应的单菌落使用 *sacB* 引物再次进行菌液 PCR 验证，体系和程序与前一次相同，再次进行琼脂糖凝胶电泳检测，将没有检测出任何条带的样品所对应的菌落转接到含有氨苄青霉素抗性的 LB 液体培养基中，于 30℃恒温振荡培养箱中培养，同时将这些对应的菌落用同源臂 A 上游引物和同源臂 B 下游引物再一次进行 PCR 扩增，结束后将此次 PCR 扩出来的片段送往生物公司进行测序操作进一步验证。

1.4.4 双交换突变株的功能验证

本次实验中对于双交换突变株的功能验证主要使用的是休止细胞反应的方法。在无机盐培养基中加入吡啶乙酸将其作为唯一的碳源和氮源，使细菌处于一种饥饿状态，观察突变株是否能在其中生长，并对不同生长时间的菌液进行全波长扫描，看吡啶乙酸是否被降解来判断突变株能否利用吡啶乙酸这一唯一碳氮源来生长。

将双交换突变株和假单胞菌属 LY1 菌株同时转接进含有氨苄青霉素抗性的 LB 液体培养基中，将其放到 30℃恒温振荡培养箱进行培养 16-24 h，准备做休止细胞反应。

首先进行初步的功能验证，在培养结束后，在超净工作台中分别取 1 mL 的菌液 5,000 rpm 离心 3 分钟，弃掉上清，用灭过菌的 1 mL 的 0.5 mg/mL 的吡啶乙酸无机盐培养基重悬菌体，转接到 0.5 mg/mL 的吡啶乙酸无机盐培养基中，加入氨苄青霉素抗性，放到 30℃恒温振荡培养箱中培养，每隔一段时间观察，看双交换突变株能否在吡啶乙酸无机盐中生长。

将之前在 LB 里培养好的假单胞菌属菌株 LY1 和突变株菌液测量 OD₆₀₀，记

录。将两种菌液分别于 8,000 rpm 下离心 10 分钟，弃掉上清后用少量的 20 mM/L 的 Tris-HCl 彻底重悬沉淀，洗掉菌体上粘有的 LB 培养基及抗生素等物质，再次 8,000 rpm 离心 10 分钟，弃掉上清后，用吡啶乙酸终浓度为 1 mg/mL 的 20 mM/L Tris-HCl 将沉淀彻底重悬，使用的体积根据之前测的 OD₆₀₀，将 OD₆₀₀ 浓缩至 6 为宜，将其放到 30℃ 恒温振荡摇床培养，每隔 2 h 取样 1 mL，12,000 rpm 离心 2 分钟后将上清液小心取出放到一个干净 1.5 mL 离心管中，标记好后放到 -20℃ 保存，取样一直持续 24 h。结束取样后将所有样品进行全波长扫描。

2 结果与分析

2.1 *iadA* 和 *iadC* 基因的定向插入失活

本次实验所使用的是 pK18mobsacBtet 质粒来构建定向插入失活所使用的重组质粒。以同源重组作为其敲除的原理。该重组质粒可以准确的敲除 LY1 菌株的 *iadA* 和 *iadC* 基因，从而能验证该基因是否在 LY1 菌株降解吡啶乙酸功能中起着决定性的作用。这部分实验的关键就是构建 pK18mobsacBtet-*iadA* 和 pK18mobsacBtet-*iadC* 重组质粒，当然该敲除质粒构建过程包含引物的设计、PCR 扩增同源臂 A 和同源臂 B 片段、载体的酶切、连接、转化、质粒提取等多个步骤，这些步骤都要依赖基因工程和分子生物学的原理和方法，这对于试验的结果有着重要的影响。

2.1.1 载体构建

根据 1.3 中的步骤过程将 *iadA* 和 *iadC* 基因的同源臂 A 和同源臂 B 分别 PCR 扩增出来，并进行胶回收操作，跑电泳验证。结果如下（见图 1）

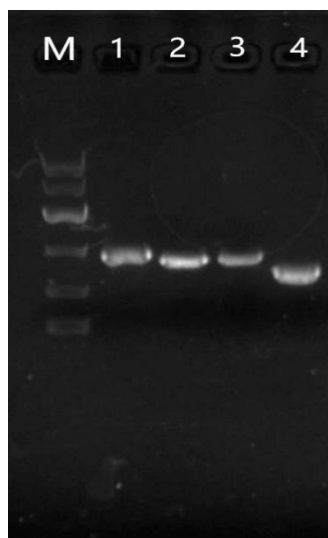


图 1 PCR 扩增同源臂 A 和同源臂 B 验证片段。

注：M，Marker；12，A 基因同源臂 A 和同源臂 B；34，C 基因同源臂 A 和同源臂 B

胶回收验证结果显示两个基因的同源臂 A 和同源臂 B 均成功扩增出来，同时根据 1.3 中的步骤将 pK18mobsacBtet 质粒进行酶切并做胶回收操作处理，跑电泳验证结果如下（见图 2）

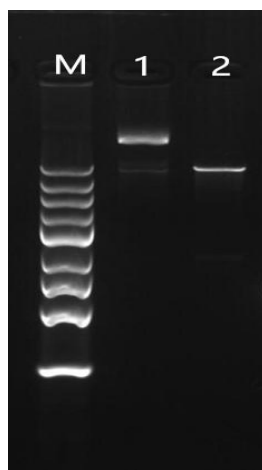


图 2 未经酶切的质粒和酶切过的质粒。

注：M，Marker；1，未经酶切的质粒；2，酶切的质粒

由图 2 可知 pK18mobsacBtet 质粒已被切开，可用作连接实验。另外连接实验中的连接产物即重组质粒太过脆弱，无法直接进行验证，只能后续通过转化后进行菌液 PCR 来进行验证。

2.1.2 转化

根据 1.3 中的过程将连接好的重组质粒 pK18mobsacBtet-*iadA* 和 pK18mobsacBtet-*iadC* 分别转化进入 Trans-T1 感受态细胞中，验证正确后分别提取质粒转化进入 S17-1 感受态细胞中，获得 S17-1 *iadA*::pK18mobsacBtet 菌株和 S17-1 *iadC*::pK18mobsacBtet 菌株，经过菌液 PCR 和琼脂糖凝胶电泳验证后，结果如下（见图 3）：

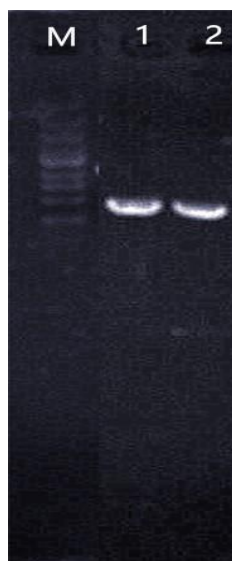


图 3 菌液 PCR 扩增验证片段。

注：M，Marker；1，*iadA* 基因验证；2，*iadC* 基因验证

菌液 PCR 扩增验证菌株结果显示，这两株 S17-1 菌株中已经分别含有 pK18mobsacBtet-*iadA* 质粒和 pK18mobsacBtet-*iadC* 质粒。

2.1.3 单交换突变株的构建

根据 1.4.1 的步骤双亲杂交后，将长出的菌进行 LB+0.1%Amp+0.1% Tet 双抗平板筛选，将筛选出的菌落进行菌液 PCR 和琼脂糖凝胶电泳检测，再用 *sacB* 引物再次验证，得出的结果如下（见图 4）

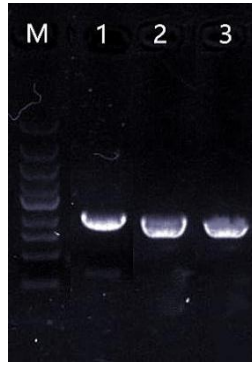


图 4 菌液 PCR 扩增验证片段。

注：M，Marker；1，菌株；2，*iadA* 基因验证；3，*iadC* 基因验证

菌液 PCR 扩增验证的结果显示，该菌株是假单胞菌属 LY1 菌株而且菌株中已经含有重组质粒质粒。

2.1.4 双交换突变株的构建

根据 1.4.2 的步骤进行双交换突变株的构建，将筛选出的菌落进行菌液 PCR 和琼脂糖凝胶电泳检测，得出的结果如下（见图 5）

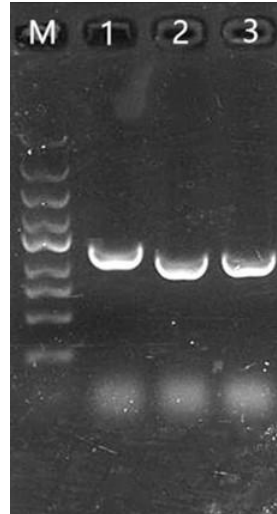


图 5 菌液 PCR 扩增验证片段。

注：M，Marker；1，菌株；2，*iadA* 基因验证；3，*iadC* 基因验证

结合图 5 菌液 PCR 扩增验证的结果显示，且 *SacB* 引物扩增无条带，初步证明这两株菌可能是构建成功的双交换突变株，后续测序验证成功，证明这两株菌确实是构建成功的双交换突变株。

2.2 双交换突变株的功能验证

1) 根据 1.4.4 步骤进行双交换突变株的功能验证实验，将假单胞菌属 LY1 菌株和双交换突变株分别接种 IAA 无机盐培养基后培养结果如下（见图 6）

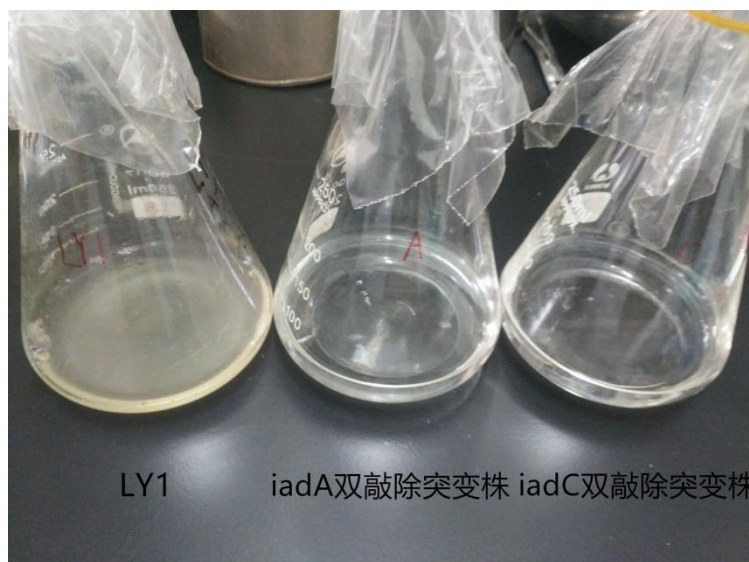


图 6 假单胞菌属 LY1 菌株和两种双交换突变株分别在 IAA 培养基中的生长情况

通过图片可以看出假单胞菌属 LY1 菌株能够在 IAA 培养基中正常生长，而两株双交换突变株均不能够在 IAA 培养基中生长。这说明了 *iadA* 和 *iadC* 基因都是菌株 LY1 吲哚乙酸代谢的关键基因。

根据 1.4.4 步骤分别对两株突变株做休止细胞反应实验，每两小时测一次全波长，结果分别如下（见图 7 和图 8）

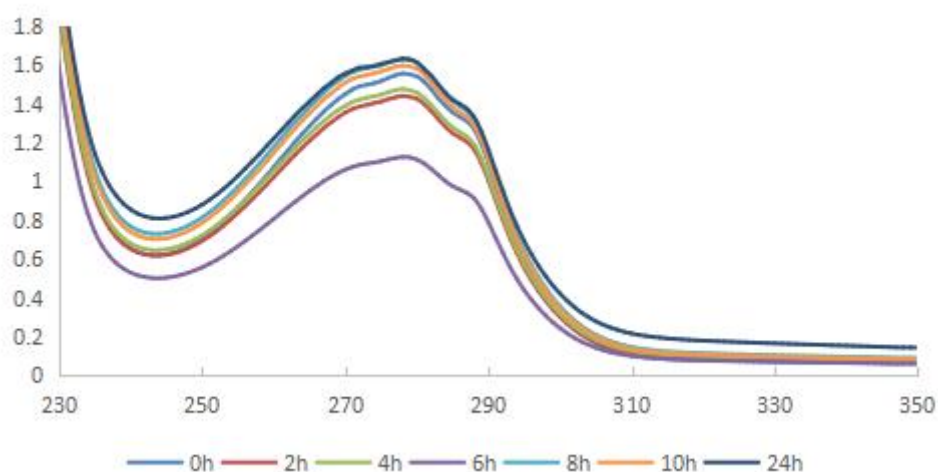


图 7 *iadA* 突变株休止细胞反应全波长扫描

由图 7 可以看出，*iadA* 基因突变株生长的 IAA 培养基中的吲哚乙酸有微量的下降，但是吸收峰的峰型没有太多的变化，这说明了 *iadA* 基因并不是催化吲哚乙酸代谢的第一个基因，*iadA* 基因催化的底物与吲哚乙酸的结构比较接近，因此吸收峰没有太多的变化。

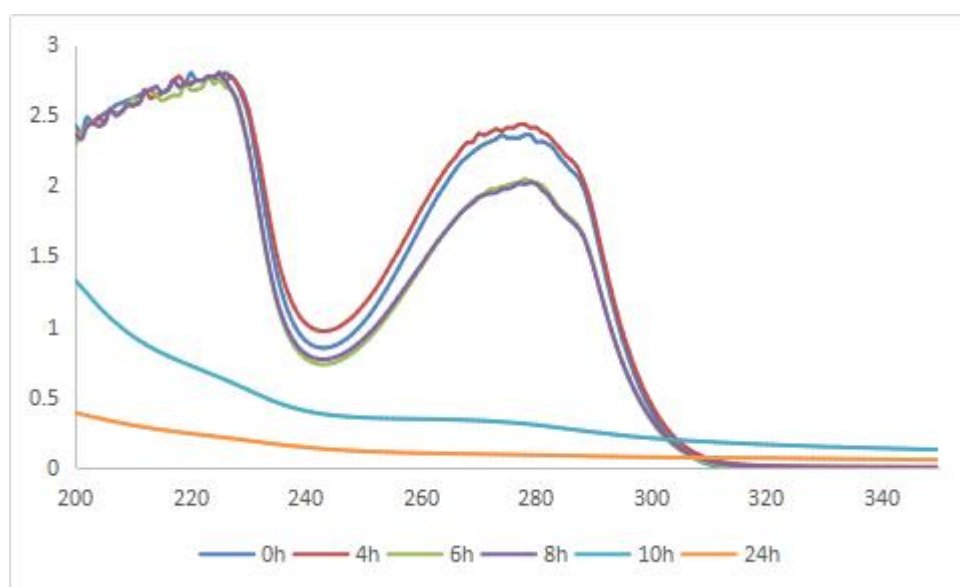


图 8 *iadC* 突变株休止细胞反应全波长扫描

由图 8 可以看出，*iadC* 基因突变株生长的 IAA 培养基中的吲哚乙酸明显被降解，实验结果证明 *iadC* 双交换菌株可以分解吲哚乙酸，并且能够生成开环产

物，因此在紫外区的吸收峰消失，*iadC* 基因的底物很有可能是吡啶乙酸代谢过程中的开环产物。

3 讨论

本论文以假单胞菌属 LY1 菌株为研究对象，对两段预测基因进行敲除来构建突变株，通过对突变株功能的验证来预测所敲除的两段基因的功能。

本次实验中采用扩增双同源臂后再和单酶切之后的 pK18mobsacBtet 质粒进行连接的方法成功构建出 pK18mobsacBtet-*iadA* 和 pK18mobsacBtet-*iadC* 转化载体。再利用含有该质粒的 S17-1 菌株与假单胞菌属 LY1 菌株进行双亲杂交，最终测序验证后获得 LY1 *iadA*::pK18mobsacBtet 和 LY1 *iadC*::pK18mobsacBtet 突变株。而且可能是已经被敲除掉代谢吡啶乙酸关键基因的 LY1 *iadA*::pK18mobsacBtet 突变株和 LY1 *iadC*::pK18mobsacBtet 突变株。成功建立了假单胞菌 LY1 菌株的定向敲除系统。

本次实验在实验的方法上取得了一定的成功，但也存在一些不足：本实验虽然成功的建立了 pK18mobsacBtet-*iadA* 和 pK18mobsacBtet-*iadC* 转化载体。后面也获得了与之对应的突变株，突变株不能够在吡啶乙酸培养基中生长，这说明了这两个基因都是吡啶乙酸代谢过程中的关键基因，通过休止细胞反应对 *iadA* 基因和 *iadC* 基因的催化底物进行了初步分析，这两个基因都不是吡啶乙酸代谢过程中的第一步基因，*iadA* 基因的催化底物是环状化合物，与吡啶乙酸结构类似，很有可能保留了吡啶环。*iadC* 基因的催化底物是开环产物。当然这两个基因的功能需要通过基因回补、中间代谢产物积累、体外克隆表达等实验进一步进行研究。在本实验的研究基础上，后续还需要展开一系列的实验继续完成假单胞菌属 LY1 菌株代谢吡啶乙酸的关键基因敲除工作的进一步相关实验，如展开相关功能基因的体外验证实验和其他相关实验等。

参考文献：

- [1] 刘元望, 李兆君, 冯瑶, 等.微生物降解抗生索的研究进展.农业环境科学学报, 2016-03-02, 22: 10-14.
- [2] 王家利, 刘冬成, 郭小丽.生长素合成途径的研究进展.植物学报, 2012-05-10, 35: 21-26.
- [3] 邓耀杰, 林鹿, 詹怀宇.白腐菌对芳香化合物的降解及其机制.环境科学与技术, 1999, 86 (3) : 8-12.
- [4] 周维, 付喜爱, 张德显, 等.基因敲除技术的研究进展.中国兽医杂志, 2015, 51 (3) : 67-69.
- [5] 苑博华, 廖祥儒, 郑晓洁, 等.吲哚乙酸在植物细胞中的代谢及其作用.生物学通报, 2005-04-20, 20: 17-21.
- [6] Zazimalova E.Napier R.M. Points of regulation for auxin action. Plant Cell Reports, 2003, 21 (7) : 625-634.
- [7] 孟凡立, 张卫国, 陈庆山, 等.插入突变在功能基因组学研究中的应用.生物信息学, 2006, 25 (1) : 86-93.
- [8] 陶果, 信吉阁, 肖晶, 等.基因敲除技术最新研究进展及其应用.安徽农业科学, 2013-10-10, 36: 11-14.
- [9] 崔佳, 万翠香.双歧杆菌插入失活载体的构建.山西医科大学学报, 2015, 46 (12) : 1180-1182.
- [10] 雷萍, 聂麦茜, 张志杰, 等.一株多环芳烃降解菌在焦化废水降解中的应用研究.西安交通大学学报, 2001, 35 (10) : 1055-1058.
- [11] Sims Gerald K, Sommers Lee E and Konopka Allan.Degradation of Pyridine by micrococcus luteus Isolated from Soil.Applied and Environmental Microbiology, 1986, 51(5): 963-968.
- [12] 吴程华, 严玉霖, 高洪, 等.Red 同源重组技术在大肠埃希菌基因敲除中的应用.上海畜牧兽医通讯, 2015-02-20, 13: 21-25
- [13] Fetzner S.Bacterial degradation of pyridine, indole, quinoline, and their derivatives under different redox conditions.Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 49(3): 237-250.

致谢

历时两个多月的论文创作过程在此划下了句号，本次实验能够得以顺利完成，首先要感谢于浩老师对我大力帮助和支持，包括一开始的论文选题到设计方案，还有最后的修改，直至本次论文的完成，万分感谢于老师能够在百忙之中抽出时间对我的实验过程提供宝贵意见和多次的指导。另外对在我实验过程中给我提供诸多帮助的实验室师兄师姐们表示万分的感谢，在这尤其要感谢赵书雪师姐，感谢师姐在实验过程中对我悉心的指导，在我迷惑时不厌其烦的为我讲解，还一次次的帮我寻找并改进试验方法，使我的论文能够得以顺利完成，再次感谢赵书雪师姐对我的大力帮助。

经过这么长时间的搜集材料，确定方案，实验操作，后期整改，才有了本篇毕业创作，在此期间我也成长了很多，学到了很多课堂上学不到的知识，也衷心的希望审阅老师们提出宝贵意见。

最后衷心祝愿那些在我论文创作过程中为我提供过帮助的人身心健康，工作顺利，万事如意！