

应用绿色荧光蛋白基因标记细菌进行生物膜结构定量 化新方法

钟卫鸿, 叶海仁, 陈建孟, 宋艳绒

(浙江工业大学生物与环境工程学院, 杭州 310032)

摘要:绿色荧光蛋白基因 pEGFP 经 CaCl_2 转化法标记 *E. coli* JMI09 菌株, 获得的标记菌株作为模式细菌接种含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄的 LB 培养基, 在摇瓶中与火山岩颗粒共混培养挂膜 (37 $^\circ\text{C}$, 120 r/min, 16 h). 用激光共聚焦扫描显微镜摄取获得火山岩填料生物膜 250 $\mu\text{m} \times 250 \mu\text{m}$ 区域不同层面的图片堆, 所获图片堆经 COMSTAT 程序处理可以获得相关的量化参数, 如 16 h 生物膜平均厚度为 0.120 844 μm , 生物膜最大厚度为 10.5 μm , 生物膜体积为 0.136 986 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$, 生物膜表面积 21 338.1 μm^2 , 生物膜比表面积为 3.36 854 $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$. 该方法也可以扩展至其他绿色荧光蛋白基因标记细菌的生物膜结构量化.

关键词:绿色荧光蛋白; 大肠杆菌; 生物膜

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2005)04-0160-05

New Method for Spatial Structure Quantification of Biofilm with GFP Tagged Bacteria

ZHONG Wei hong, YE Hai ren, CHEN Jian meng, SONG Yan rong

(College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China)

Abstract: Green fluorescent protein (GFP) gene was applied to mark *E. coli* JMI09 by the method of CaCl_2 transformation. The GFP-tagged cells was inoculated into the LB medium containing 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Ampicillin to develop biofilm on the surface of lava by mix-culture with lava particles in flask under 37 $^\circ\text{C}$, 120 r/min for 16 h. The fluorescent images stack of different layer at specific area (250 $\mu\text{m} \times 250 \mu\text{m}$) on lava covered with biofilm was obtained by confocal scanning laser microscopy. The quantifying parameters of biofilm spatial structure could be acquired after the image information was calculated by COMSTAT program, i.e., the average thickness of specific area of biofilm after 16 h was 0.120 844 μm , the maximum thickness was 10.5 μm , the volume was 0.136 986 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$, the surface area was 21 338.1 μm^2 , and the surface area per volume biofilm was 3.36 854 $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$. This method might be expanded to reflect the spatial structure of biofilm with any other GFP tagged bacteria.

Key words: Green Fluorescent Protein (GFP); *E. coli*; biofilm

生物膜是微生物治理环境污染的重要方法之一。在生物膜技术应用研究中, 一般均以“暗箱”模式, 即不管填料上生物膜的结构变化以及生物膜内部的菌群数量与分布的变化, 进行各种工艺研究及优化。部分研究对生物膜内部的菌群情况采用 MPN (Maximum Possible Number) 方法计数, 费时而且需离线进行。另有采用荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 方法^[1, 2]和 PCR 分子鉴定方法^[3, 4]分析活性污泥中特定细菌 (如硝化细菌) 数目。FISH 方法比 MPN 方法有很大进步, 但仍须进行以荧光标记探针杂交操作后方可进行荧光观察。PCR 方法需要核酸提取, PCR 反应和凝胶电泳鉴定。这些方法在快速简便和实时性方面不如荧光蛋白 (Green Fluorescent Protein, GFP) 基因标记技术。GFP 较多作为融合蛋白表达的报告基因用于考察表达效率等^[5, 6], 最近在环境微生物技术等研究中也获得较多应用^[7, 8]。基于三维图像处理技术的日

臻成熟, 尤其是激光共聚焦显微镜 (confocal laser scanning microscopy, CLSM) 的应用, Arne Heydorn 等进行了流式槽 (Flow chamber) GFP 标记生物膜空间结构的量化的尝试, 获得了较好的结果^[9, 10], Rodrigues 等用 CLSM 分析了 GFP 标记的 *Pseudomonas putida* ATCC 17 514 菌株在 PAHs 固体结晶表面生物膜的三维分布及成膜行为^[11]。本文作者进行过火山岩和有机碳泡沫 (carbon foam) 为填料的生物塔废气净化研究, 2 种均取得了较好的效果。由于火山岩易于控制颗粒大小和观察表面成膜情况, 故用它进行本研究的成膜填料材料^[12]。用 GFP 基因转化 *E. coli* JMI09 菌株, 以绿色荧光转化子为模式生物进行火山岩表面挂膜培养, 对生物膜空间

收稿日期: 2004-09-09; 修订日期: 2004-11-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20276070); 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2002 AA649310); 浙江省自然科学基金资助项目 (Y304091)

作者简介: 钟卫鸿 (1966 ~), 男, 教授, 博士, 主要从事应用微生物和环境微生物学研究。

结构进行定量化新方法的初步探索,摸索用 CLSM 摄取生物膜图片堆以获得相关的生物膜定量化参数,如生物膜平均厚度,最大厚度,生物量表面积等,用以表征生物膜的空间结构特征,为进一步进行其他各种细菌生物膜的微观结构表征打下技术基础.

1 材料与方法

1.1 材料

E. coli JMI09, 购自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心;原核表达载体:pEGFP,购自 BD Biosciences 公司.火山岩为成都芝竹堂产品,敲碎过筛获得直径 5~6 mm 均匀颗粒.

1.2 实验方法

(1) CaCl_2 法制备 *E. coli* JMI09 感受态细胞和转化参照文献[13]方法进行.

(2) 转化子中质粒的碱法提取和电泳鉴定 参照文献[13]方法进行.相关软件:UVP 凝胶图象分析系统 GDS8000 自带 Labwork 工具软件.

(3) 生物量测定(干重法) 取转化子细胞培养液 5 mL,在 10 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用 5 mL 去离子水重新悬浮细胞,10 000 r/min 离心 10 min,弃上清,菌泥置 104 °C 烘箱内烘至恒重.

(4) 质粒浓度的测定 质粒提取液经过适当倍数的稀释后,用紫外分光光度计分别测定 260 nm, 280 nm 吸光值 A ,质粒的浓度可由 A_{260} 的值来估算,质粒的纯度以 A_{260}/A_{280} 来衡量,如果比值约为 2 时表明质粒纯度较高.

(5) 转化子细胞蛋白荧光表达的测定 转化子菌体培养至生长稳定期进行荧光表达的测量,用荧光分光光度计在 480 nm 激发光下激发,测定不同培养条件下的菌体在 510 nm 处的相对荧光强度.分别取 5 mL 培养液 10 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用生理盐水悬浮菌体沉淀,并稀释至适宜浓度,以生理盐水为空白测定其相对荧光强度.采用等量菌体比较方法考察了菌体荧光强度的差异,以消除菌体浓度差异的影响.

(6) 火山岩填料挂膜 火山岩填料加入 *E. coli* JMI09 的 GFP 转化子培养液(250 mL 摇瓶中装 50 mL 含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp 的培养基)中混合培养(37 °C,120 r/min,16 h),然后置 LB 平板稳定成膜.

(7) 图片堆(image stack)的获得和处理 Leica TCS-SP 激光共聚焦显微镜(CSLM, confocal scanning laser microscopy)选定 3 个 250 \times 250 μm 挂膜填料区域,以 0.2 μm 步长进行不同层面扫描,获得图

片堆.在 MATLAB 6.5 环境下运行 COMSTAT 程序(丹麦技术大学 Arne Heydorn 博士提供),首先运行 checkall 命令,进行所有图片确认,看是否完整,再运行 look 命令,确定阈值(threshold value),最后运行 COMSTAT 命令获得所需的参数.

2 结果与讨论

2.1 GFP 基因转化子的筛选

用上述转化方法,将 pEGFP 载体转入感受态细胞.通过含 Amp(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 平板进行筛选,培养 16 h 后观察发现阴性对照平板未长出菌落,阳性对照平板长出菌落,而且可见光下就能看见菌落的绿色荧光.证明 pEGFP 载体已成功地转入菌株 JMI09 并且抗性基因获得了表达.将转化子分别进行荧光显微镜观察和平板划线培养,结果(图 1)显示绿色荧光蛋白基因已在 *E. coli* JMI09 细胞内获得很好的表达.该转化子细菌可以作为以下生物膜的空间结构定量化方法研究的模式细菌.

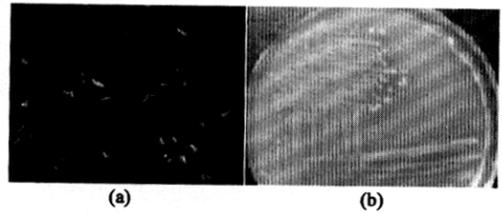


图 1 GFP 在 *E. coli* JMI09 细胞中的表达
(a: Olympus 荧光显微镜,400 \times ; b: 平板菌落)

Fig. 1 GFP expression in *E. coli* JMI09

2.2 转化子中质粒的酶切鉴定

从 pEGFP 限制酶切图谱(图 2)可以看出 pEGFP 有 2 个 *Xba*I 和 1 个 *Hind*III 酶切位点.因而,从转化阳性菌落细胞重新提取质粒后分别用酶 *Xba*I 和一个 *Hind*III 进行酶切验证.电泳结果图 3 (a)显示在 3 kb 与 2.5 kb 之间有一条约 2.7 kb 带,这与预期的结果吻合;但在电泳图上缺少一条 0.76 kb 条带,这可能是分子量过小,造成 DNA 条带浓度过低而无法检测.由图 3(b)可以看出在 3 kb 与 4 kb 之间有一条带,约 3.4 kb.由于 *Hind*III 是 pEGFP 载体的唯一酶切位点,条带的大小与载体的吻合.从上述分析可知,原核表达载体 pEGFP 已成功地转入菌株 *E. coli* JMI09,并以游离质粒形式表达.

2.3 转化子细胞质粒稳定性

转化子细胞中质粒在细胞分裂时向子代细胞分配不均匀以及 DNA 的缺失、插入或重排均可引起

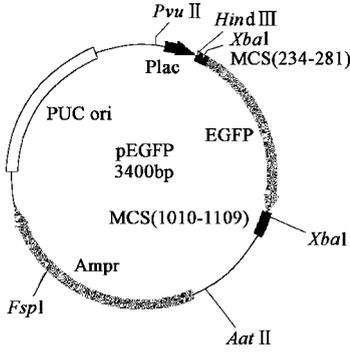


图 2 pEGFP 载体限制性酶切图谱
Fig. 2 Restriction map of pEGFP vector

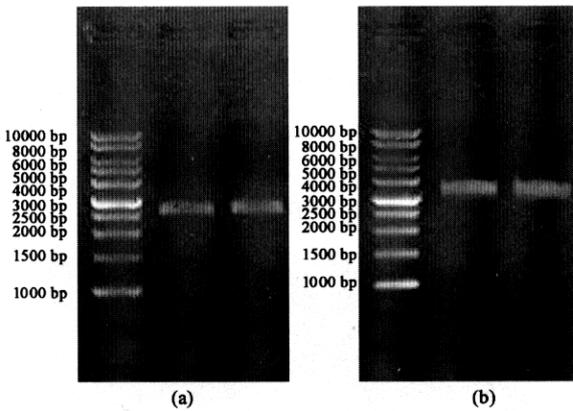


图 3 转化子提取质粒 Xba I 和 Hind III 酶切电泳图
Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of extracted plasmid digested with Xba I (a) and Hind III (b)

质粒的不稳定.在不同的细菌细胞中质粒的稳定性是不同的.从表 1 可以明显看出,获得的转化子转接第二次后,带抗性的菌落数就只占 62.5%.此后,每转接 1 次,质粒就分别丢失 16.8%,21.6%.说明该质粒在宿主菌 *E. coli* JM109 中并不是十分稳定.表 1 表示转化子传代后菌落计数及质粒的维持率.其中“第 2 代”表示转化子第 1 代在含氨苄(100 μ g/mL)的液体 LB 中培养 12 h 后菌体涂布;第 3 代表示上述第 2 代在不含氨苄的液体 LB 中培养 12 h 后的菌体;第 4 代表示上述第 3 代在不含氨苄的液体 LB 中培养 12 h 后的菌体;可见在没有选择压力情况下,GFP 质粒的维持率 3 代后只有 78%,为保证用荧光强度表征菌体细胞生物膜的准确性,需在挂膜过程中保持选择压力.

2.4 培养温度和培养液氨苄浓度对转化子细胞 GFP 质粒产量和荧光蛋白表达的影响

在有氨苄选择压力的情况下,氨苄的添加浓度

表 1 不同代菌体的质粒稳定性

Table 1 The stability of the plasmid on different generation				
代数	菌落数 (含 Amp)	菌落数 (无 Amp)	抗性菌比例/ %	质粒维持率/ %
第 2 代	212	339	62.5	
第 3 代	217	417	52.0	83.2
第 4 代	49	100	49.0	78.4

和培养温度等均有可能影响转化子细胞中 GFP 质粒的产量及其荧光表达.通常细菌的培养温度为 37 $^{\circ}$ C,分别考察了 30 $^{\circ}$ C,37 $^{\circ}$ C,45 $^{\circ}$ C 培养温度对转化子细胞中质粒数量的影响,结果(图 4)显示温度的降低(30 $^{\circ}$ C)使菌体的单位细胞质粒产量下降了,温度升高(45 $^{\circ}$ C)虽然使生物量有所上升,但单位细胞质粒产量无显著改变,且有所下降.因而采用 37 $^{\circ}$ C 培养温度有利于提高转化子细胞中质粒产量.培养温度对转化子细胞荧光蛋白表达的影响也有类似结果(表 2).从表 2 可以看出,不同的培养温度对菌体荧光蛋白的表达产生了一定的影响.45 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 时菌体的相对荧光强度要高于 30 $^{\circ}$ C 时的.也就是说 37 $^{\circ}$ C 适合菌体荧光蛋白的表达,也适合菌体生产质粒.但考虑到菌体的生长浓度可能会影响其相对荧光强度,故又取上述培养液离心,取等量菌体稀释后测定其相对荧光强度,结果得出的结论仍与上述一致.故本研究选择 37 $^{\circ}$ C 为最佳培养温度.

表 2 不同培养温度和氨苄浓度对菌体相对荧光强度的影响

条件	培养温度/ $^{\circ}$ C			氨苄浓度/ μ g \cdot mL $^{-1}$			
	30	37	45	20	50	100	150
相对荧光强度	4.1	5.0	5.0	8.0	8.1	8.2	8.2

液体培养基中添加氨苄,有利于通过选择压力提高转化子中 GFP 质粒保持率,但其添加浓度对菌体细胞中质粒产量和荧光蛋白表达的影响需要具体考察.液体培养基中添加终浓度分别为 20 μ g/mL,50 μ g/mL,100 μ g/mL,和 150 μ g/mL 的氨苄考察了不同氨苄青霉素浓度对细胞中质粒产量的影响,结果(图 5)显示,随着氨苄浓度的上升,质粒的产量也随之升高.这说明一定的选择压力有利于质粒的积累和表达.但是,随着氨苄浓度的上升,细胞生物量呈明显下降趋势.由于较高的抗性浓度有利于质粒的稳定性,且氨苄青霉素很容易失效,提高抗性浓度也是有利于筛选含质粒的菌体细胞.然而,实际生产中,较高的筛选浓度未必符合成本和安全方面的要求;尤其在安全方面,这个问题更加突出.不同的

Amp 浓度对菌体荧光蛋白的表达的影响实验结果(表 2)表明 Amp 浓度的提高除了加强菌体的质粒稳定性,增加含质粒细胞的生长累积外,对荧光蛋白的表达及其相对荧光强度却无显著影响.因此,若从实际需要来看,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度即可.以下生物膜实验均采用该浓度进行.

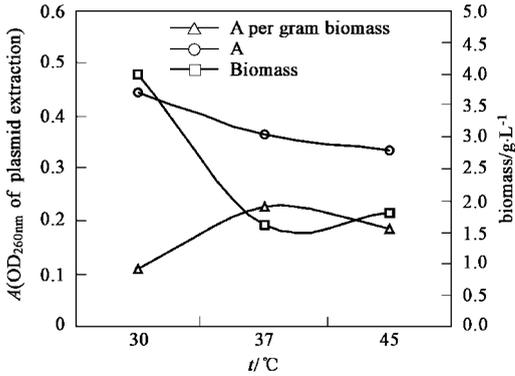


图 4 培养温度对质粒产量和细胞生长的影响

Fig. 4 The effect of temperature on the plasmid production and the cell growth

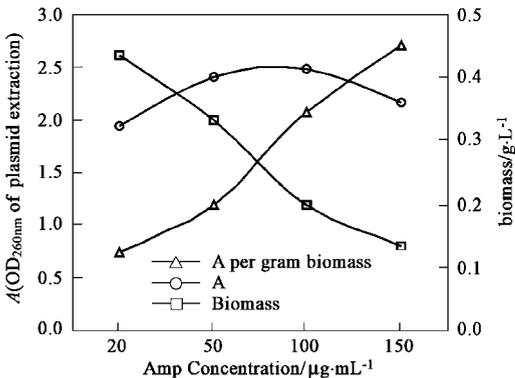


图 5 氨苄浓度对质粒产量和细胞生长的影响

Fig. 5 The effect of Ampicillin concentration on the plasmid production and the cell growth

2.5 CLSM 扫描结果

根据上述结果,选择含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄 LB 培养液,37 $^{\circ}\text{C}$,在摇瓶中与火山岩共混培养 16 h 驯养生物膜,然后用激光共聚焦显微镜选定(250 $\mu\text{m} \times 250\mu\text{m}$)挂膜填料区域进行不同层面扫描,获得图片堆如图 6.从图 6 分析可知,随着径向深度的改变,生物量的改变可从荧光强度的强弱反应出来.第 1 张由于处于生物膜的最上层,而火山岩填料的表面特征为凹状,形成中间空穴的特征,因此形成了边缘荧光强,中间弱的现象.随着深度的增加,与填料凹穴底部的贴近,第 4 张的荧光强度达到最强说明此

层面的生物量达到最大但随后荧光的强度逐渐减弱,这与火山岩填料表面的多凹穴形状特征相符,因此,绿色荧光蛋白是一种很好的分子标记,可用于标记生物膜菌群形态的研究.

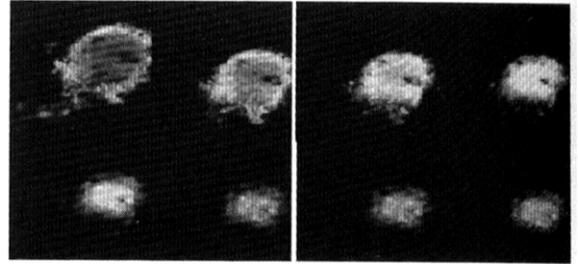


图 6 火山岩不同层面扫描生物膜图片堆

Fig. 6 Biofilm image stacks of different layers on lava

2.6 COMSTAT 程序的定量化分析

从上述的分析可知通过 CSLM 扫描图片进行生物膜的定性分析是可行的.为了能够实现定量化分析,用 COMSTAT 程序对生物膜的扫描图片堆进行了计算,获得了相关的生物膜空间结构数据(表 3).从表 3 可知,生物膜的生物量和平均厚度都少于 1,说明培养 16 h 后,填料的生物膜生长不是很理想,没有全面覆盖填料的表面.同时也可从生物量表面积分析得出,生物量表面积 21 338.1 μm^2 远远小于选定的区域面积 62 500 μm^2 ,说明在填料上约 2/3 区域没有生物膜的存在,表明 16 h 共混培养后填料表面的生物膜生长不是很理想,没有全面覆盖填料的表面,这可能是营养液分布不均或填料表面特征造成的.因此,为了能形成一个覆盖全面的生物膜,要通过改善营养液的合理供给以及延长生物膜的驯养时间等措施来达到驯养合适的生物膜结构.另外,表面与生物量比值(比表面积)为 3.36 854 远远大于 1,表明在填料上长成的菌落或菌苔是一种凸形态结构,这与菌株平板形态观察相一致.从上述分析可知,COMSTAT 程序定量化数据的能反映生物膜的空间结构状态,可以用于解析生物膜的一些基础结构特征.

3 结论

原核表达载体 pEGFP 转化 *E. coli* JM109 获得的转化子可以作为进行生物膜的空间结构定量化方法研究的模式细菌.用激光共聚焦扫描显微镜摄取火山岩填料生物膜不同层面的图片堆,所获图片堆经 COMSTAT 程序处理成功获得相关的定量化参数,如生物膜平均厚度,最大厚度,生物量表面积

表 3 GFP 转化 *E. coli* JM109 与火山岩共培养 16 h 的生物膜

Table 3 The structure parameters of biofilm on lava after 16 h culture with GFP tagged *E. coli* JM109

参数	数据
单位面积生物膜体积/ $\mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2}$	0.136986
选定图象区生物膜表面积/ μm^2	21338.1
比表面积/ $\mu\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-3}$	3.36854
粗糙系数	1.93739
平均厚度/ μm	0.120844
最大厚度/ μm	10.5

等.本方法为表征细菌生物膜的空间结构特征提供了新思路和方法.在获得其他细菌的荧光标记细菌(如硝化细菌),可以进行多种细菌生物膜的微观结构表征.本研究仅考虑了单菌种生物膜的情况,实际应用中更多的会是多菌种构成的混合菌群的生物膜,可以进行双(多)荧光标记技术来解决这个难题,以开展各种生物膜处理工艺的生物膜构效关系研究.

致谢:感谢丹麦技术大学 Arne Heydorn 博士为本研究工作提供了 Comstat 程序及 Comstat 运行的技术咨询.同时感谢浙江大学许正平教授和高向伟同学提供的共聚焦扫描显微镜图象技术帮助.

参考文献:

- [1] Wecke J, Kersten T, Madela K, *et al.* A novel technique for monitoring the development of bacterial biofilms in human periodontal pockets[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, **191** (1): 95 ~ 101 .
- [2] Davenport R J, Curtis T P, Goodfellow M, *et al.* Quantitative use of fluorescent in situ hybridization to examine relationships between mycolic acid-containing actinomycetes and foaming in activated sludge plants[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2000, **66**(3): 1158 ~ 1166 .

- [3] 明镇寰,岳春梅,徐炳森,等.用 PCR 技术检测生物硝化池污水中硝化细菌(Nitrobacteria)的研究[J].浙江大学学报(理学版),1999,**26**(2):83 ~ 86 .
- [4] 明镇寰,岳春梅.生物硝化池污水中硝化细菌的快速定量研究[J].环境科学学报,2002, **22**:796 ~ 798 .
- [5] 马立新,史巧娟,周俊初,等.以 GFP 为报告基因并选择适用于 G⁻ 菌的广谱稳定性质粒 pTR102 构建广宿主启动子探针应用于大豆根瘤菌启动子的分离与克隆[J].微生物学报,1999,**39**(5):408 ~ 415 .
- [6] 罗文新,张军,杨海杰,等.通过检测增强型绿色荧光蛋白很好地评价其构建的一种带增强子的原核高效表达载体 pTO-T7 在大肠杆菌中的表达效率[J].生物工程学报,2000,**16**(5):578 ~ 581 .
- [7] 叶海仁,钟卫鸿,陈建孟.绿色荧光蛋白分子标记在环境微生物学研究中的应用[J].环境污染与防治,2003, **26**(6):353 ~ 355 .
- [8] 韩云,邢新会,杨敏,等.用于废水处理系统中目标酵母动态解析的绿色荧光蛋白基因质粒构建.环境科学,2004,**25**(1):40 ~ 44 .
- [9] Heydorn A, Nielsen A T, Hentzer M, Sternberg C, *et al.* Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT[J]. Microbiology, 2000, **146**:2395 ~ 2407 .
- [10] Heydorn A, Kjar B, Hentzer M, Parsek M, *et al.* Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms[J]. Microbiology, 2000, **146**:2409 ~ 2415 .
- [11] Rodrigues A C, Wuertz S, Brito A G, *et al.* Three-dimensional distribution of GFP-labeled *Pseudomonas putida* during biofilm formation on solid PAHs assessed by confocal laser scanning microscopy[J]. Water Science & Technology 2003, **47**(5):139 ~ 142 .
- [12] Kyung S C, Hee W R, Nae Y L. Biological deodorization of hydrogen sulfide using porous lava as a carrier of *Thiobacillus thiooxidans* [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, **90**(1):25 ~ 31 .
- [13] 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔.分子克隆实验指南[M]. 第三版.北京:科学出版社,2003.26 ~ 32;96 ~ 99;387 ~ 396 .

更正启示

本刊 2005 年第 1 期第 120 页图 5 硝基苯在 S2 电极上的线性伏安曲线(pH = 8)横坐标 V/mV vs SCE 应为 E/V vs SCE,特此更正。