

Hg²⁺ 诱导发光报告基因系统的构建及其检测红壤中残汞的研究

何伟^{1,2}, 韩诚³, 钟文辉^{3*}, 林先贵¹

(1. 中国科学院南京土壤研究所土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 南京 210008; 2. 南京师范大学生命科学学院, 南京 210046; 3. 南京师范大学环境科学与工程系, 南京 210046)

摘要:将汞诱导型启动子 P_{merT} 和其调控基因 $merR$ 与 $egfp$ 基因融合构建发光报告基因系统. 通过 mini-Tn5 系统把 $merR-egfp$ 插入到 *Pseudomonas putida* 染色体 DNA 上, 构建成为在 Hg²⁺ 诱导下能特异性表达绿色荧光蛋白的工程菌, 并将其应用于检测江西红壤中汞污染. 当土壤中汞含量在 0.04 ~ 50 mg·kg⁻¹ 范围内时, 采用流式细胞仪测定工程菌表达的荧光强度, 发现荧光强度与汞污染的含量呈正相关, 且最低检测含量为 0.04 mg·kg⁻¹. 土壤背景中一定含量的 Cr²⁺、Zn²⁺、Co²⁺、Cu²⁺、Pb²⁺、Ag⁺ 对汞污染测定均无显著影响. 正交试验结果表明, 孵育温度是影响荧光测定的主要因素, 其最佳范围为 30 ~ 35℃. 将初始含量为 0.1 mg·kg⁻¹ 的 Hg²⁺ 添加入江西红壤并孵育 15 和 30d 后, 运用原子吸收和工程菌分别对残汞进行检测, 结果显示工程菌对可溶性残汞、生物质残汞、有机残汞和剩余残汞均有响应, 有效检出 35% ~ 64%, 其有效性限与传统分析方法一致.

关键词:发光; 汞; 报告基因; 红壤; 构建

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)10-3045-08

Construction of Hg²⁺-induced Luminescent Reporter Gene System and Its Application to Detect Mercury in Red Soil

HE Wei^{1,2}, HAN Cheng³, ZHONG Wen-hui³, LIN Xian-gui¹

(1. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China; 3. Department of Environmental Science and Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract: A luminescent reporter gene system was constructed by fusing the mercury-inducible promoter, P_{merT} , and its regulatory gene, $merR$ with a promoterless reporter gene EGFP. A stable whole-cell reporter was created by mini-Tn5 and introducing the $merR-egfp$ system cassette into the chromosome of *Pseudomonas putida* strain, then applied it for mercury detection in the red soil of Jiangxi province. the fluorescence density of the sensor strain was confirmed in soil extraction and fluorescence intensity was quantified by flow cytometry. The results showed positive correlation with the mercury pollutant in the concentration range of 0.04-50 mg·kg⁻¹. The background heavy metal ions such as Cr²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺, Ag⁺ at certain level did not interfere with the measurement. The key factor for detecting the fluorescence density was the induction time and the optimal temperature for EGFP expression was 30-35℃. Spiked with 0.1 mg·kg⁻¹ Hg²⁺ and after 15 and 30 days incubation, red soil samples were extracted and evaluated water soluble, bioavailable, organic matter bound and residual fractions of mercury by both sensor strain and analytical way. The sensor strain appeared to have a detection range similar to that of atomic absorption spectroscopy (AAS) method and the effective detection ratio was 35% -64%.

Key words: luminescent; mercury; reporter gene; red soil; construction

随着我国工业化进程的不断发展和环境保护意识日益提高, 如何对土壤汞污染的生物毒性快速诊断和长期监测, 为土壤污染预防与治理提供依据, 成为近年来土壤环境科学研究的目标和方向. 目前已有多种理化方法和生物学方法应用于污染物的检测, 其中利用携带发光报告基因的微生物来检测汞污染物的方法因其灵敏度较高、操作简便易行、运行费用较低、应用广泛, 得到了众多研究者的重视^[1-4]. 把报告基因的编码序列和基因表达调控序列相融合形成嵌合基因, 或与其它目的基因相融合,

在诱导控制下进行表达^[5]. 通过检测该融合基因的表达产物即可半定量地检测诱导底物. 在土壤重金属污染, 尤其是土壤汞污染的检测研究中, 该方法已经得到重视并有少数应用于土壤毒性检测和诊

收稿日期: 2010-11-16; 修订日期: 2011-01-24

基金项目: 土壤与农业可持续发展国家重点实验室基金项目 (0751010017); 南京师范大学“211 工程”重点学科建设项目 (1843203623); 江苏省普通高校自然科学基金资助项目 (10KJD610001)

作者简介: 何伟 (1979 ~), 男, 硕士, 讲师, 主要研究方向为环境微生物技术, E-mail: myway@njnu.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: zhongwenhui@njnu.edu.cn

断^[6~8].但由于目前研究尚处于起步阶段,国内外相关报道所见不多.且由于尚无标准的实验方法和缺乏对污染物检测的针对性和专一性,使得如何更好地确定土壤汞污染毒性的剂量-效应关系,从而建立快速特异性针对土壤汞污染诊断方法,成为大家面临的难题.

本研究选取我国典型的红壤作为实验材料,采用携带有特异识别汞离子的发光报告基因的工程菌,分析了各种毒性条件下,该工程菌发光信号对汞污染的响应和污染物毒性变化的关系;探讨了不同测定条件对发光信号的影响,以及模拟条件下对红壤汞污染进行长期监测并与传统

化学分析方法相比较,以期为该基因工程菌应用于土壤汞污染的毒性诊断提供了理论和实践的依据.

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试质粒、菌株和培养条件

本研究所用质粒、菌株如表 1 所示.所有 *Pseudomonas putida* 于 30℃ 恒温培养.所有 *Escherichia coli* 于 37℃ 恒温培养.采用的培养基均为 LB 培养基:蛋白胨 10 g·L⁻¹,酵母膏 1 g·L⁻¹,NaCl 8 g·L⁻¹,pH 7.0~7.5,121℃ 灭菌 30 min.

表 1 供试质粒、菌株的特性及来源
Table 1 Plasmids and strains

质粒、菌株	基因型	来源
pEGFP-N1	Km ^r , <i>egfp</i>	本实验室保藏
pUC57-mer	Ap ^r , <i>mer</i>	本实验室保藏
pUT-Km	Ap ^r , Km ^r , Tn5	本实验室保藏
pUT-ME	Ap ^r , Tn5, <i>mer-egfp</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> DH5α	<i>hsdR</i> , <i>recA</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i>	本实验室保藏
<i>E. coli</i> SM10 (λpir)	<i>Thi</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>tonA</i> , <i>lacY</i> , <i>supE</i> , <i>recA</i> :: <i>RP4-2-Tc::Mu</i> , Km ^r , Ap ^r , λpir	本实验室保藏
<i>E. coli</i> SM10 (pUT-ME)	<i>Thi</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>tonA</i> , <i>lacY</i> , <i>supE</i> , <i>recA</i> :: <i>RP4-2-Tc::Mu</i> , Ap ^r , λpir, <i>mer-egfp</i>	本研究构建
<i>P. putida</i> N1	Plasmid-free derivative of wild-type	CGMCC (1.1003) ¹⁾
BMB-ME	<i>P. putida</i> N1:: <i>mer-egfp</i>	本研究构建
<i>E. coli</i> RK600	Cm ^r	本实验室保藏

1) CGMCC:中国普通微生物菌种保藏管理中心

1.1.2 供试土壤

土壤采自中国科学院红壤生态试验站(红壤站)长期肥料定位试验地,位于江西省鹰潭市余江县(28°15'20"N,116°55'30"E).土壤样品于 2009 年 3 月采集于耕作层(0~20 cm).采样后剔除可见的根系,过 2 mm 筛,4℃ 保存.所有分析在 2 个月内完成.土壤 pH 6.5.

1.1.3 试剂

CrCl₂、ZnCl₂、CoCl₂、CuCl₂、PbAc、AgNO₃、HgCl₂ 均为国产分析纯试剂,以水溶液的形式投加入风干后的红壤样品中.重金属离子投加量以 μg·kg⁻¹ 风干土计算.

所用抗生素及使用浓度分别为 Amp 100 μg·mL⁻¹、Kan 50 μg·mL⁻¹、Cam 100 μg·mL⁻¹.各种 DNA 限制酶、DNA 聚合酶及 T4 DNA 连接酶、Gel extraction Kit 均购于 TaKaRa 公司,上海 Sangon 公司合成引物,其它化学试剂均为分析纯.

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 操作和转化

DNA 抽提、质粒的提取、酶切及连接、质粒转化、三亲本杂交均采用常规方法^[9].

PCR 扩增条件:94℃ 60 s, 55℃ 60 s, 72℃ 60 s, 28 个循环;72℃ 10 min.扩增体系:10×buffer 2 μL, primer 10 pmol, dNTP 0.2 mmol·L⁻¹, ExTaq 0.5 μL, 补水至 20 μL 将试剂混匀.

1.2.2 土壤浸提液的制备

将 10 g 红壤样品用去离子水清洗 2 遍,过滤并自然风干至含水量为 20% 后过 2 mm 筛.分别将各种重金属元素液加入样品中至指定浓度,在避光条件下,室温放置 1 d.然后依次用去离子水、1 mol/L 醋酸铵溶液、30% H₂O₂、2 mol/L 硝酸进行处理^[10],分别获得 WS (water soluble)、BA (bioavailable)、OM (organically bound)、RES (residual fraction) 土壤浸提液,以此来分别评价水溶性残余重金属、生物可转换残余重金属、有机残余重金属和其他形态残余重金属.所有土壤浸提液测定前需调整 pH 值至红壤样品原始 pH 值 6.5,并进行适当稀释.

1.2.3 检测菌株 BMB-ME 对红壤中各种形态汞污染测定程序.

将含 HgCl_2 浓度分别为 0.04、0.08、0.12、0.16、0.20、0.24 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 6 份红壤样品,经处理后再分别获得 WS、BA、OM、RES 土壤浸提液.分别用原子吸收法测定各个样品中残汞的浓度并稀释调整各样品的残汞浓度依次为.再分别将 100 μL 检测菌株 BMB-ME 对数期菌悬液加入 9.9 mL 不同浓度的残汞溶液中.在 30°C 条件下温育 12 h 后,各取 5 mL 样品液,分别离心洗涤 2 次弃去背景残液,并将细胞重悬于 5 mL 生理盐水中.将样品悬液在波长为 450 nm 的激发光下,用美国 BD 公司 FACS Calibur 流式细胞仪测定其 540 nm 波长的荧光强度 (fluorescence density, FD).每个悬液样品在测定荧光强度前用 720 型分光光度计测定其 D_{600} ,以确定菌体细胞的浓度.然后以相对荧光强度 (relative fluorescence density, $\text{RFD} = \text{FD} \cdot D_{600}^{-1}$) 代表每个样品中的荧光信号的强弱.

1.2.4 影响检测菌株 BMB-ME 测定红壤汞污染的条件及其评价方法

设计 $L_9(3^4)$ 正交试验,选取相对荧光强度测定过程中的 4 种影响因素并设置低、中、高 3 个水平,分别测定 0.20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 Hg^{2+} 污染土壤 WS 浸提液样品诱导检测菌株 BMB-ME 表达荧光的相对强度.具体 4 种影响因素和不同影响水平的设置为:培养温度 (25、30、 35°C)、初始细胞数量 ICN (10^3 、 10^4 、 $10^5 \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$)、诱导表达时间 IT (5、10、15 h)、培养 pH (6、7、8).

1.2.5 多种重金属元素复合污染对检测菌株 BMB-ME 测定汞污染的影响测定方法

设计 $L_{18}(3^7)$ 正交试验,选取我国土壤中常见的 7 种不同重金属污染元素的水溶液添加入红壤样品中,并依各种重金属在土壤中的背景值^[11]使每种重金属污染初始浓度设置为低、中、高 3 个水平,具体为: Cr^{2+} (19.3、61、150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、 Zn^{2+} (28.4、74.2、161 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、 Co^{2+} (4、12.7、31.2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、 Cu^{2+} (7.3、22.6、55.1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、 Pb^{2+} (10、26、56.1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、 Ag^+ (0.027、0.13、0.41 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、 Hg^{2+} (0.006、0.065、0.272 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).将污染的红壤样品经过处理后获得 WS 土壤浸提液,并测定每种浸提液样品诱导检测菌株 BMB-ME 表达荧光的相对强度.

1.2.6 检测菌株 BMB-ME 与原子吸收共同测定一定浓度红壤汞污染的方法

将初始浓度为 0.1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 Hg^{2+} 污染红壤样品,在室温下分别放置 15 d 和 30 d,并保持土壤 50% 含水量.后经处理获得 WS、BA、OM、RES 土壤浸提液.再分别用检测菌株 BMB-ME 测定法和原子吸收法测定各个样品中残汞的浓度.

1.2.7 流式细胞仪测定菌体荧光强度方法

采用美国 BD FACS Calibur 型流式细胞仪测定.

1.2.8 原子吸收法测定重金属的浓度方法

采用日本岛津 600A 型原子吸收分光光度仪测定.

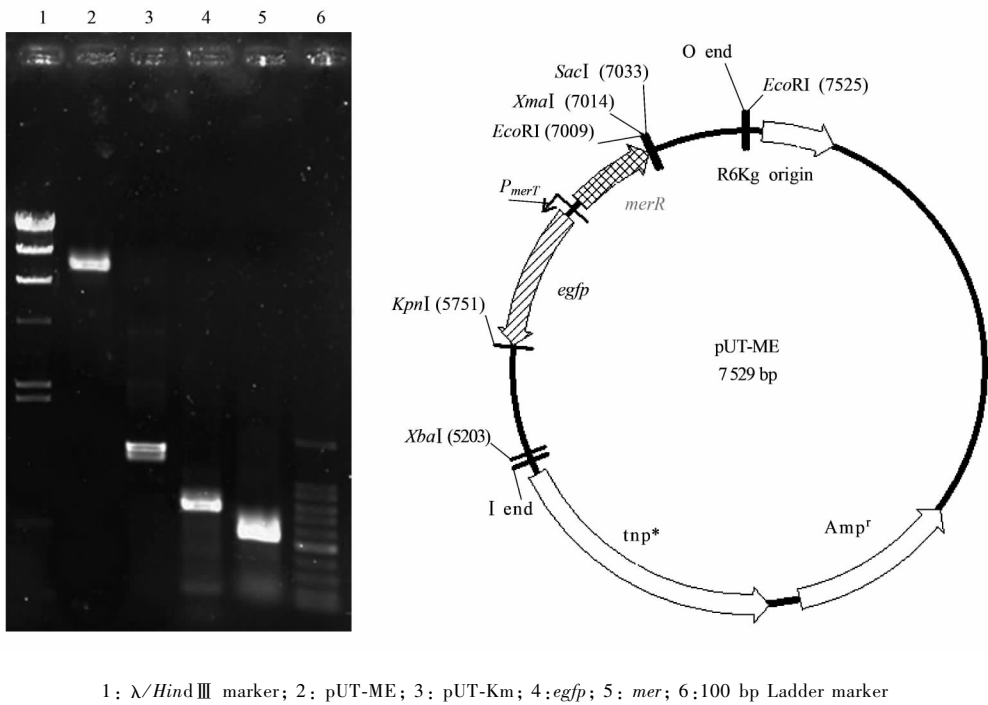
2 结果与分析

2.1 检测菌株 BMB-ME 的构建及验证

通过 PCR 反应,分别从 pEGFP-N1 和 pUC57-mer 上扩增出 mer 片段和增强型绿色荧光蛋白基因 egfp.再用限制性酶切和 T4 连接酶构建形成整合的 mer-egfp 系统,并将其插入到 pUT-Km 载体中构建成为 pUT-ME (图 1).将 pUT-ME 转入 *E. coli* SM10 (λpir) 宿主细胞中,并把 *E. coli* SM10 (pUT-ME) 与辅助菌 RK600 和 *P. putida* N1 在滤膜上进行三亲本杂交^[12].由于 pUT-Km 为自杀性质粒,且 mer-egfp 系统位于 pUT-ME 载体的 mini Tn5 转座元件中,于是在转座酶和辅助菌 RK600 提供的 π 因子的共同作用下,mer-egfp 片段可以转座插入到 *P. putida* N1 染色体 DNA 上.通过无抗性的连续传代消除 *E. coli* SM10 (pUT-ME) 与辅助菌 RK600 所携带的抗性标记,最后用抗性平板筛选出携带 Kan 抗性标记并且能够稳定遗传的菌体.进一步通过 16S rDNA 验证和遗传稳定性传代,验证和筛选到 1 株 mer-egfp 系统的确随 TN5 转座子转座插入到了 *P. putida* N1 的染色体 DNA 上的特异型发光报告基因工程单克隆菌株,并将其命名为检测菌株 BMB-ME.

2.2 检测菌株 BMB-ME 测定红壤中各种形态汞污染的效果评价

用流式细胞仪测定各个红壤处理液样品诱导检测菌株 BMB-ME 表达荧光的强度与不同组分汞污染浓度的关系如图 2 所示.4 种红壤处理液样品中的残汞均可诱导检测菌株 BMB-ME 表达荧光信号.且信号的强度随着汞污染浓度的提高呈正相关增长,其相关系数依次为 0.984 (WS)、0.983 (BA)、0.977 (OM)、0.985 (RES).而同一份红壤样品的不同处理液 (WS、BA、OM、RES) 则表现出不同的信号强弱,这与汞污染在土壤当中存在的形式和土壤对汞污染的吸附解吸有关.解吸量的多少意味着在



1: λ /Hind III marker; 2: pUT-ME; 3: pUT-Km; 4: *egfp*; 5: *mer*; 6: 100 bp Ladder marker

图 1 pUT-ME 质粒电泳图谱和构建图谱

Fig. 1 Electrophoresis map and construction map of pUT-ME plasmid

一定条件下重金属对地下水和作物吸收等的潜在影响^[13],且不同的土壤对不同的重金属污染的吸附和解吸特征也不同.由图 2 可以看出汞污染在红壤中的浓度分布由高到低依次为:水溶性残汞、生物可转换残汞、有机残汞和其他形态残汞.并分别占可检测总量的 47%、24%、16%、13%.

2.3 影响检测菌株 BMB-ME 测定红壤汞污染的条件评价及测定条件的优化

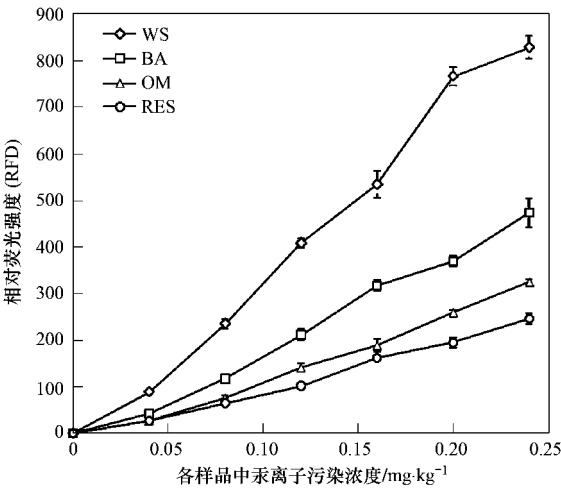


图 2 相对荧光强度与不同组分汞污染浓度关系

Fig. 2 Relations between relative fluoresce units and different Hg^{2+} concentrations

由于检测菌株 BMB-ME 测定红壤汞污染是基于诱导表达绿色荧光蛋白从而形成发光信号得以检测,因此设计正交实验对诱导表达过程中的主要因素进行评价,即可对其测定条件加以优化.实验组合和实验结果如表 2 所示.根据 4 种影响因素极差大小顺序为 $D > A > B > C$,即可以判断诱导温度是影响检测菌株 BMB-ME 测定红壤汞污染的最主要因素,其次依次为诱导时间、初始细胞数量和 pH 值.同时,对于诱导时间而言,3 个水平所得的平均 RFD 的均值由大到小依次为均值 3、均值 2、均值 1,即意味着诱导时间为 15 h 条件下测定的效果较好,而较短的诱导时间发光信号的强度也较弱.同理,可以确定当初始细胞浓度为 $10^3 CFU \cdot mL^{-1}$ 、pH 值为 7、诱导温度为 $35^{\circ}C$ 、诱导时间为 15 h 时是检测菌株 BMB-ME 测定的最佳条件.

2.4 多种重金属元素复合污染对检测菌株 BMB-ME 测定红壤汞污染的影响测定

多种重金属复合污染红壤样品,所设计的实验组合和各种 WS 浸提液诱导检测菌株 BMB-ME 表达的相对荧光强度如表 3 所示.由平均 RFD 和极差结果可以看出,在各种不同重金属,且在高、中、低各种浓度的共同干扰下,同一水平的汞污染均表现出相似的相对荧光强度,其极差值远远大于其他重金属因素的极差值,因此说明检测菌株 BMB-ME 对汞

表 2 不同条件组合下检测菌株 BMB-ME 测定红壤汞污染的 $\text{L}_9(3^4)$ 正交试验结果分析

Table 2 Layout of the $\text{L}_9(3^4)$ matrix and results for combined factors on BMB-ME measuring mercury pollution in red soil					
编号	A (IT)	B (ICN)	C (pH)	D (温度)	平均 RFD
1	1 (5 h)	1 (10^3)	1 (6)	1 (25℃)	240
2	1 (5 h)	2 (10^4)	2 (7)	2 (30℃)	284
3	1 (5 h)	3 (10^5)	3 (8)	3 (35℃)	267
4	2 (10 h)	1 (10^3)	2 (7)	3 (35℃)	361
5	2 (10 h)	2 (10^4)	3 (8)	1 (25℃)	285
6	2 (10 h)	3 (10^5)	1 (6)	2 (30℃)	255
7	3 (15 h)	1 (10^3)	3 (8)	2 (30℃)	329
8	3 (15 h)	2 (10^4)	1 (6)	3 (35℃)	357
9	3 (15 h)	3 (10^5)	2 (7)	1 (25℃)	273
均值 1	263. 667	310	284	266	
均值 2	300. 333	308. 667	306	289. 333	
均值 3	319. 667	265	293. 667	328. 333	
极差	56	45	22	62. 333	

表 3 各种重金属污染组合下检测菌株 BMB-ME 测定红壤汞污染的 $\text{L}_{18}(3^7)$ 正交试验结果分析

Table 3	Layout of the $L_{18}(3^7)$ matrix and results for combined heavy metal irons on BMB-ME measuring mercury pollution in red soil							
编号	A(Hg^{2+})	B(Cr^{2+})	C(Zn^{2+})	D(Co^{2+})	E(Cu^{2+})	F(Pb^{2+})	G(Ag^{+})	平均 RFD
1	1(0.006)	1(19.3)	1(28.4)	1(4)	1(7.3)	1(10)	1(0.027)	20
2	1(0.006)	2(61)	2(74.2)	2(12.7)	2(22.6)	2(26)	2(0.13)	18
3	1(0.006)	3(150)	3(161)	3(31.2)	3(55.1)	3(56.1)	3(0.41)	10
4	2(0.065)	1(19.3)	1(28.4)	2(12.7)	2(22.6)	3(56.1)	3(0.41)	208
5	2(0.065)	2(61)	2(74.2)	3(31.2)	3(55.1)	1(10)	1(0.027)	229
6	2(0.065)	3(150)	3(161)	1(4)	1(7.3)	2(26)	2(0.13)	213
7	3(0.272)	1(19.3)	2(74.2)	1(4)	3(55.1)	2(26)	3(0.41)	930
8	3(0.272)	2(61)	3(161)	2(12.7)	1(7.3)	3(56.1)	1(0.027)	971
9	3(0.272)	3(150)	1(28.4)	3(31.2)	2(22.6)	1(10)	2(0.13)	961
10	1(0.006)	1(19.3)	3(161)	3(31.2)	2(22.6)	2(26)	1(0.027)	21
11	1(0.006)	2(61)	1(28.4)	1(4)	3(55.1)	3(56.1)	2(0.13)	17
12	1(0.006)	3(150)	2(74.2)	2(12.7)	1(7.3)	1(10)	3(0.41)	14
13	2(0.065)	1(19.3)	2(74.2)	3(31.2)	1(7.3)	3(56.1)	2(0.13)	219
14	2(0.065)	2(61)	3(161)	1(4)	2(22.6)	1(10)	3(0.41)	201
15	2(0.065)	3(150)	1(28.4)	2(12.7)	3(55.1)	2(26)	1(0.027)	230
16	3(0.272)	1(19.3)	3(161)	2(12.7)	3(55.1)	1(10)	2(0.13)	956
17	3(0.272)	2(61)	1(28.4)	3(31.2)	1(7.3)	2(26)	3(0.41)	938
18	3(0.272)	3(150)	2(74.2)	1(4)	2(22.6)	3(56.1)	1(0.027)	972
均值 1	16.667	392.333	395.667	392.167	395.833	396.833	407.167	
均值 2	216.667	395.667	397	399.5	396.833	391.667	397.333	
均值 3	954.667	400	395.333	396.333	395.333	399.5	383.5	
极差	938	7.667	1.667	7.333	1.500	7.833	23.667	

污染的检测具有高度专一性. 同时, 由比较其他各因素的极差值大小可见 Ag^{+} 的极差值略高, 表明其对测定有一定程度的干扰. 且根据 Ag^{+} 的 3 个浓度水平所得的均值大小可以看出, 随着 Ag^{+} 浓度的提高, 测定的荧光强度却略有降低. 这可能是由于高浓度 Ag^{+} 对细胞毒性较强, 致使一部分细胞死亡的原因. 从总体上看, 实验组合中各重金属污染的最高浓度选取的是土壤环境背景值置信范围的上限值, 通常一般土壤污染不会达到或超过该值; 同时, 各种污染因素的极差值均远远小于汞污染因素的极差值. 因

此可以判断, 在一定范围内, 检测菌株 BMB-ME 对于测定红壤中的汞污染不受其他重金属污染的干扰.

2.5 检测菌株 BMB-ME 与原子吸收共同测定一定浓度红壤汞污染的比较

用 2 种测定方法所得实测汞污染浓度值记录于表 4. 由结果可以看出, 15 d 后, WS 和 BA 中的可检测汞污染约占总检出浓度的一半左右, 另外一半则被红壤吸附并转化为 OM 和 RES 的形式. 同时, 总共约有 48% ~ 64. 1% 的汞污染依然残留在土壤中.

30 d 后,汞污染的总残余量降至 35% ~ 53.7%。根据检测菌株 BMB-ME 与原子吸收共同测定红壤汞污染的结果,前者与后者测定 WS、BA 残余汞的检出率基本一致,且汞污染残余浓度随时间变化值也相似约为 13% ~ 10.4%,由此可以说明检测菌株

BMB-ME 对于测定红壤 WS、BA 残余汞污染与原子吸收法有效性一致。但检测菌株 BMB-ME 对于汞污染 15d 的 OM 残余汞未检出,同时 RES 残余汞测定值与原子吸收法差异较大,说明前者检测限和灵敏度不如后者。

表 4 15 d 和 30 d 后红壤各种浸提液中汞污染的浓度值¹⁾
Table 4 Mercury concentrations of extracts in red soil after 15 and 30 days exposure

浸提液	时间 /d	初始污染浓度 /mg·kg ⁻¹	BMB-ME 法		原子吸收法	
			实测浓度/mg·kg ⁻¹	检出率/%	实测浓度/mg·kg ⁻¹	检出率/%
WS	15	0.1	0.016	16	0.015 3	15.3
	30	0.1	0.013	13	0.014 9	14.9
BA	15	0.1	0.009	9	0.009 8	9.8
	30	0.1	0.007	7	0.008 7	8.7
OM	15	0.1	—	—	0.005 6	5.6
	30	0.1	—	—	0.009 8	9.8
RES	15	0.1	0.023	23	0.033	33.4
	30	0.1	0.015	15	0.020 3	20.3
Total 15			0.050 3	48	0.063 7	64.1
Total 30			0.039 7	35	0.053 7	53.7

1) WS: 水溶性残余重金属; BA: 生物可转换残余重金属; OM: 有机残余重金属; RES: 其他形态残余重金属

3 讨论

检测菌株 BMB-ME 所采用的报告基因是 *egfp* 基因,其表达的增强型绿色荧光蛋白在 64 和 65 个氨基酸位置分别将苯丙氨酸和丝氨酸替换成了亮氨酸和苏氨酸。相比较各种报告基因,例如野生型 *gfp*、*dsRed*、*lux*、*luc*、*lac*,虽然 EGFP 的表达和高级结构的折叠需要较长时间,造成检测时响应速度不够快,但其蛋白质性质稳定,最大荧光信号波长较长便于检测,无需添加外源显色物质,不会影响测定。同时,在 488 nm 激发波长和等量可溶性蛋白条件下,EGFP 表现出了比野生型绿色荧光蛋白高 35 倍的荧光强度^[14],因此可以避免菌体自身背景荧光的干扰。另外,激发和检测 EGFP 荧光强度手段多样,在长波紫外或近可见光波长激发下,即可用荧光分光光度计、酶标仪、荧光显微镜、甚至是手持式紫外灯等即可进行检测和观察,便于应用于原位和在线检测。

检测菌株 BMB-ME 的最低检测限可达到 0.04 mg·kg⁻¹,该灵敏度已经足够用于检测绝大多数汞污染土壤或其他环境样品^[15]。目前已有关于报告基因检测重金属污染物的相关报道^[16~19],且最低检测限已经低至 1.6 nmol/L,但应用于典型土壤测定的尚未见到。在检测菌株 BMB-ME 检测红壤汞污染过程中,同一份红壤样品的不同处理液(WS、BA、OM、RES)表现出不同的信号强弱,因此可知红壤

对于重金属的具有一定吸附和转化作用,但本课题未对比其他土壤对重金属的吸附和转化特征,以期留待后续研究。

由结果可知,诱导表达的温度是检测菌株 BMB-ME 测定的最大影响因素,因为在一定温度条件下荧光蛋白才能正确折叠形成具有最大荧光强度的高级结构状态,这与之前的相关报道一致^[20]。诱导表达荧光蛋白的时间也对检测菌株 BMB-ME 的测定结果具有较大影响,而且过久的细胞培养和过长的诱导时间会导致基因的过量表达,从而使得测定的绝对荧光值产生误差或不准确^[19],因此本研究使用相对荧光强度(RFD)来最大程度的减小误差。

目前已有多种方法可以检测汞污染,例如:原子吸收光谱法(AAS)、反式高效液相色谱(RP-HPLC)、气相色谱(GS)、冷蒸气原子荧光光谱、气质联用色谱(ICP-MS)等^[21~28]。这些方法均可高效灵敏的检测样品中污染物的各种成分和形态。本研究所采用的微生物发光传感器法的检测限和灵敏度虽然不如原子吸收法,但其有效性一致,且操作简单,成本低廉,能直观地反映出污染物对生物体的作用,因此将其作为一种对特定污染物定性定量的方法是行之有效的^[29]。同时,检测菌株 BMB-ME 可用于描述土壤微生物原位活性、指示土壤污染和营养状况、监测土壤生态过程等。样品处理简单,可以实现原位、在线监测。

在对汞污染红壤样品进行 15 d 和 30 d 的测定

过程中,用微生物发光传感器法和原子吸收法均检测到残汞浓度随着污染时间的延长有约 10% 的下降. 将时间延长至 45 d 后测定发现残汞浓度仍略有下降(结果未列出),这可能是汞污染在自然条件下或在红壤土著微生物作用下有一部分转化为单质汞游离到大气中的原因. 至于其他土壤类型有无类似特征,需要做进一步验证比较.

由于汞离子在微生物的细胞膜上的吸收和转运并非主动扩散,而是经由特定的蛋白质通道进出细胞,且不同的微生物对汞离子的吸收和转运特征也不同,因此用不同宿主构建的微生物发光传感器测定得到的结果有可能会有不小的差异. 本研究虽然优化了微生物发光传感器信号表达的条件,但将其应用于土壤原位观察和测定仍然受到诸如土壤类型、植物根际环境等多种条件的限制和制约^[30]. 因此进一步的研究宿主细菌对于污染物的吸收和转运机制,尝试使用各种宿主细菌,以便设计出更加适用的微生物发光传感器将成为下一步研究方向.

4 结论

(1) 通过基因操作,构建并筛选到 1 株特异型发光报告基因工程单克隆菌株 BMB-ME. 该菌株染色体 DNA 上转座插入了发光报告基因系统 *mer-egfp*, 因此可在 Hg^{2+} 诱导下特异性地表达绿色荧光蛋白,且具有遗传稳定性.

(2) 4 种红壤处理液样品中的残汞均可诱导检测菌株 BMB-ME 表达荧光信号,且信号的强度随着汞污染浓度的提高呈正相关增长. 汞污染在红壤中的浓度分布由高到低依次为:水溶性残汞、生物可转换残汞、有机残汞和其他形态残汞. 并分别占可检测总量的 47%、24%、16%、13%.

(3) 诱导温度是影响检测菌株 BMB-ME 测定红壤汞污染的最主要因素,其次依次为诱导时间、初始细胞数量和 pH 值. 当初始细胞浓度为 10^3 CFU·mL⁻¹、pH 值为 7、诱导温度为 35℃、诱导时间为 15h 时是检测菌株 BMB-ME 测定的最佳条件.

(4) 在土壤环境背景值置信范围内,检测菌株 BMB-ME 对于测定红壤中的汞污染不受其他重金属污染的干扰,其对汞污染的检测具有高度专一性.

(5) 检测菌株 BMB-ME 对于测定红壤 WS、BA 残汞污染与原子吸收法有效性一致. 但检测菌株 BMB-ME 对于汞污染 15d 的 OM 残汞未检出,同时 RES 残汞测定值与原子吸收法差异较大,说明检测菌株 BMB-ME 检测限和灵敏度不如原子吸收法. 需

要进一步地研究宿主细菌对于污染物的吸收和转运机制,尝试使用各种宿主细菌,以便设计出更加适用的微生物发光传感器.

参考文献:

- [1] Bastos A E, Cassidy M B, Trevors J T, *et al.* Introduction of green fluorescent protein into phenol-degrading *Alcaligenes faecalis* cells and their monitoring in phenol-contaminated soil [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, **56**: 255-260.
- [2] Chakraborty T, Babu P G, Alam A, *et al.* GFP expressing bacterial biosensor to measure lead contamination in aquatic environment [J]. *Current Science*, 2008, **94**: 800-805.
- [3] Gu M B, Chang S T. Soil biosensor for the detection of PAH toxicity using an immobilized recombinant bacterium and a biosurfactant [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2001, **16**: 667-674.
- [4] Hansen L H, Sorensen S J. The use of whole-cell biosensors to detect and quantify compounds or conditions affecting biological systems [J]. *Microbial Ecology*, 2001, **42**: 483-494.
- [5] 郭婷, 何伟, 钟文辉, 等. 报告基因技术及其在土壤质量监测中的应用 [J]. *生态学报*, 2009, **29**(12): 6733-6740.
- [6] Barkay T, Turner R R, Rasmussen L D, *et al.* Luminescence facilitated detection of bioavailable mercury in natural waters [J]. *Methods in Molecular Biology*, 1998, **102**: 231-246.
- [7] Bontidean I, Mortari A, Leth S, *et al.* Biosensors for detection of mercury in contaminated soils [J]. *Environmental Pollution*, 2004, **131**: 255-262.
- [8] Endo G, Yamagata T, Narita M, *et al.* Bioluminescence biosensor for the detection of organomercury contamination [J]. *Acta Biotechnologica*, 2003, **23**: 123-129.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. (2nd ed) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 1989.
- [10] Petanen U, Romantschuk M. Use of bioluminescent bacterial sensors as an alternative method for measuring heavy metals in soil extracts [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2002, **456**: 55-61.
- [11] 魏复盛, 陈静生, 吴燕玉, 等. 中国土壤环境背景值研究 [J]. *生态学报*, 1991, **12**(4): 12-19.
- [12] Kristensen C S, Eberl L, Sanchez-Romero J M, *et al.* Site-specific deletions of chromosomally located DNA segments with the multimer resolution system of broad host range plasmid RP4 [J]. *Journal of Bacteriology*, 1994, **177**: 52-58.
- [13] Traina S J, Doner H E. Heavy metal induced releases of manganese (II) from a hydrous manganese dioxide [J]. *Soil Science Society of America*. 1985, **49**: 317-321.
- [14] Cormack B P, Valdivia R H, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP) [J]. *Gene*, 1996, **173**: 33-38.
- [15] Omura T, Kiyono M, Pan H H. Development of a specific and sensitive bacteria sensor for detection of mercury at picomolar levels in environment [J]. *Journal of Health Science*, 2004, **50**: 379-383.
- [16] Hansen L H, Sorensen S J. Versatile biosensor vectors for

- detection and quantification of mercury [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, **193**: 123-127.
- [17] Harkins M, Porter A J, Paton G I. The role of host organism, transcriptional switches and reporter mechanisms in the performance of Hg-induced biosensors [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, **97**: 1192-1200.
- [18] Roberto F F, Barnes J M. and Bruhn D F. Evaluation of a GFP reporter gene construct for environmental arsenic detection [J]. *Talanta*, 2002, **58**: 181-188.
- [19] Fu Y J, Chen W L, Huang Q Y. Construction of two lux-tagged Hg²⁺-specific biosensors and their luminescence performance [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, **79**: 363-370.
- [20] Baird G S, Zacharias D A, Tsien R Y. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral [J]. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 2000, **97**: 11984-11989.
- [21] Logar M, Horvat M, Falnoga I. *et al.* A methodological study of mercury speciation using Dogfish liver CRM (DOLT-2) [J]. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 2000, **366**: 453-460.
- [22] Chen W Y, Wang Y C, Kuo M S. Determination of total mercury and methylmercury in human hair by graphite-furnace atomic absorption spectrophotometry using 2, 3-dimercaptopropane- 1-sulfonate as a complexing agent [J]. *Analytical Sciences*, 2002, **18**: 255-260.
- [23] Nagashima K, Murata T, Kurihara K. Pretreatment of water samples using UV irradiation-peroxodisulfate for the determination of total mercury [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2002, **454**: 271-275.
- [24] Capelo J L, Rivas G M, Oliveira L G, *et al.* Mercury determination by FI-CV-AAS after the degradation of organomercurials with the aid of an ultrasonic field: The important role of the hypochlorite ion [J]. *Talanta*, 2006, **68**: 813-818.
- [25] Cairns W R L, Ranaldo M, Hennebelle R, *et al.* Speciation analysis of mercury in seawater from the lagoon of Venice by on-line pre-concentration HPLC-ICP-MS [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, **622**: 62-69.
- [26] Geng W, Nakajima T, Takanashi H, *et al.* Determination of mercury in ash and soil samples by oxygen flask combustion method-Cold vapor atomic fluorescence spectrometry (CVAFS) [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, **154**: 325-330.
- [27] Leopold K, Harwardt L, Schuster M, *et al.* A new fully automated on-line digestion system for ultra trace analysis of mercury in natural waters by means of FI-CV-AFS [J]. *Talanta*, 2008, **76**: 382-388.
- [28] Margetinova J, Houserova P P, Kuban V. Speciation analysis of mercury in sediments, zoobenthos and river water samples by high-performance liquid chromatography hyphenated to atomic fluorescence spectrometry following preconcentration by solid phase extraction [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, **615**: 115-123.
- [29] Chen W, Bruhlmann F, Richins R D. *et al.* Engineering of improved microbes and enzymes for bioremediation [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, **10**: 137-141.
- [30] Barkay T, Gillman M, Turner R R. Effects of dissolved organic carbon and salinity on bioavailability of mercury [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**: 4267-4271.