

用于环境污染物遗传毒性评价的重组发光细菌载体的构建

黄新新, 何苗*, 施汉昌, 蔡强

(清华大学环境科学与工程系水环境保护研究所, 北京 100084)

摘要: 基因重组发光菌在水质毒性的评价中具有重要的作用, 本研究从污染物遗传毒性损伤的机制出发, 构建 2 种遗传毒性新型基因重组发光菌载体 PUCD-*uurA*、PUCD-*alkA*. 用 PCR 法从大肠杆菌 W3110 中扩增 *uurA*、*alkA* 基因, 将其与 pGEM-T easy 载体连接后测序. 测序正确的 *uurA*、*alkA* 片段及 PUCD615 载体均用 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切, 连接后电转化导入宿主菌 JM109. 挑取克隆, 提取质粒用 PCR 鉴定, 阳性克隆再进行测序. 结果表明, *uurA*、*alkA* 基因 PCR 扩增出的片段为 237 bp、326 bp, 测序结果与 GenBank 中 *uurA*、*alkA* 序列进行 BLAST 比对, 同源性均为 99%, 表明扩增序列正确. 与 PUCD615 载体连接后的测序结果表明, *uurA*、*alkA* 基因已正确地插入到 PUCD615 的多克隆位点, 方向和读码框正确, 2 种载体构建成功. 通过优化连接及转化条件, 可将大片段的 PUCD615 载体与短片段的插入序列连接成功, 构成重组载体.

关键词: 重组发光菌; 遗传毒性; PUCD-*uurA*、PUCD-*alkA* 载体

中图分类号: X17 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)11-3159-07

Construction of Recombinate Luminescence Bacteria Vector to Evaluate the Genetoxic of Environment Pollutant

HUANG Xin-xin, HE Miao, SHI Han-chang, CAI Qiang

(Division of Water Environment, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Recombinate luminescence bacteria have the important role in evaluating water toxicity. Two recombinant luminescence bacteria vectors PUCD-*uurA* and PUCD-*alkA* were constructed to investigate the impaired mechanism of pollutant genetic toxicity. The genes of *uurA* and *alkA* were amplified by PCR from *E. coli* W3110, sequenced after ligated with pGEM-T easy vector. The PCR products and PUCD615 vector were all digested with *Bam*H I, *Eco*R I, then be linked and imported into JM109 with electrotransformation. Several clones were selected and identified by PCR and sequencing. The results reviewed that the length of the *uurA* and the *alkA* fragments were 237 bp, 326 bp. When they were sequenced and blasted in GenBank, the homology of sequences reached 99% indicated the amplified results correct. The results of sequencing ligated with PUCD615 reviewed that the fragments of *uurA* and *alkA* had been inserted into the multiple clone site correctly, the insert direction and reading frame were also exactly. Optimizing the condition of ligation and transformation, the large fragment of PUCD615 and the short inserted sequences can be ligated successfully.

Key words: recombinant luminescence bacterium; genetic toxicity; PUCD-*uurA*、PUCD-*alkA* vector

环境介质中存在多种有毒有害的污染物, 对人类及生态环境构成了严重的威胁. 基于生物效应来评价水中污染物的生物毒性是保障环境安全的重要手段. 在诸多的生物测试技术中, 采用发光细菌评价水质的急性毒性是目前国内外广泛采用的手段, 但受限于天然发光细菌大多为海洋细菌, 对复杂的水质条件响应的敏感性、稳定性都不甚理想. 因此, 近年来国际上许多研究机构针对水质毒性评价的适宜微生物展开了广泛的研究, 其中通过基因工程技术从发光细菌中克隆荧光素酶基因(*lux*), 并重组到对污染物敏感的受体菌中表达, 构建成基因工程菌, 用于水质毒性监测与评价, 在毒性响应的效率和灵敏性等方面显示了较传统发光细菌监测法的明显优势; 并可构建特异性响应的特定发光细菌, 实现对某

一类污染物的特异识别和评价.

随着对毒性机制研究的深入和对污染物检测需求的增加, 诱导型重组发光细菌受到越来越广泛的关注. 美国 Tennessee 大学的 Applegate 等^[1~3] 对用于识别污染物的诱导型重组发光细菌进行了较多研究, 构建了可检测 BTEX(苯、甲苯、乙苯、二甲苯)、三氯乙烯等有机物的工程菌. 美国的 van Dyk 等^[4~8] 学者也从 20 世纪 90 年代初开始重组发光菌的研究, 构建了一系列识别毒性损伤机制的重组发光细菌,

收稿日期: 2007-11-27; 修订日期: 2008-03-15

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划重点项目(2006BAC19B06); 浙江省重大科技专项社会发展项目(2007C13010)

作者简介: 黄新新(1974~), 女, 博士后, 主要研究方向为分子生物学及水污染控制, E-mail: xxhuang@mail.tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: hemiao@mail.tsinghua.edu.cn

并有学者将构建的重组菌用于生物传感器的研究^[9-11].本研究构建的 2 种重组发光菌载体 PUCD-*uvrA*、PUCD-*alkA* 可适应我国特定的环境和水质污染检测发挥应有的价值.

本研究采用的 PUCD615 为经过改造的载体,在原先 PUCD5B 载体的基础上插入部分 PUC19 的多克隆位点,并插入 *luxCDABE* 全基因盒.构建重组体的 *lux* 基因可以采用 *luxAB*,或者 *luxCDABE* 全基因盒.前者必须外加底物(脂肪醛)才能实现生物发光,而后者则不需要^[12],故使用更加快捷简便,适于连续在线检测或用于传感器,具有更广泛的应用前景.由于 *luxCDABE* 全基因盒长超过 6 kb(*luxAB* 只有 3 kb 左右),增加了其构建的难度,因此目前国内的研究大多数只利用 *luxAB* 构建基因工程菌,但添加脂肪醛,影响了此类重组发光细菌应用的便捷性和检测的准确性. PUCD615 含 *luxCDABE* 全基因盒作为报告基因,可以很好地克服上述缺点.

遗传毒性污染物由于其对人体健康的巨大危害而倍受关注,对这类污染物的识别和评价也具有重要的意义.本研究从污染物遗传毒性损伤的机制出发,针对我国特定的水质条件和环境条件来构建遗传毒性新型基因重组发光菌. *uvrA*、*alkA* 是与细菌的 DNA 损伤修复调控相关的基因,其启动子属于强启动子.将 *uvrA* 或 *alkA* 插入 PUCD615 的多克隆位点,与含有 *lux* 基因的载体 PUCD615 相融合形成重组体,正常生理状况下,下游 *lux* 基因的表达受到抑制;当具有遗传毒性的物质存在时, DNA 受损产生的单链 DNA 将激活蛋白,解除 *LecA* 阻遏蛋白对 P/O 区的抑制,使下游的 *lux* 基因在 *uvrA* 或 *alkA* 的强启动作用下得以表达,发出荧光.将该载体转化入合适的宿主菌,筛选敏感的组合重组发光细菌,即可实现对实际水质毒性的评价.

1 材料与方法

1.1 实验材料及试剂

质粒 pUCD615(含有无启动子的 *luxCDABE* 全基因盒, Amp⁺、Km⁺), Sayler 教授惠赠; pGEM-T easy 载体购自 Promega 公司; 大肠杆菌 W3110 由军事医学科学院周建光教授赠送, 大肠杆菌 TOP10 购自 Invitrogen 公司, 本实验室保存、电转化感受态细胞 JM109 购自宝生物工程(大连)公司; *Taq* DNA 聚合酶、DNA Marker、限制性内切酶 *EcoR* I, *BamH* I、DNA Ligation Kit Ver. 2.0 均购自宝生物工程(大连)公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、PCR 产物纯化

试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 质粒小提、大提试剂盒购自威格拉斯公司, 其它试剂均为分析纯试剂.

1.2 *uvrA*、*alkA* 基因引物设计

利用 Primer 5.0 软件, 根据 GenBank 中 *uvrA* (M13495.1)、*alkA* (K02498.1) 的序列分别设计一对引物, 并在引物两端分别引入了限制性内切酶 *BamH* I、*EcoR* I 的酶切点. 引物由宝生物工程(大连)公司合成, 序列如下:

uvrA 引物:

5'-ACTTTTGGATCCGTGTAAACGCGCGATTG-3'

5'-A5GCAGCGAATTCTTCCCGGATTAAACGCTT-3'

alkA 引物:

5'-ACTTAAGGATCCGCAAAGCATTGAAGGCAG-3'

5'-AGCAGCGAATTTCATCCCAACATCCACGACC-3'

1.3 DNA 提取及 PCR

取 1.5 mL 大肠杆菌 W3110, 以 CTAB 法提取基因组 DNA, 用 100 μ L d₂H₂O 溶解. 取 2 μ L DNA 模板进行以下的 PCR 反应: 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L, dNTP Mixture 1 μ L, MgCl₂ 2 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.25 μ L, d₂H₂O 调整终体积至 25 μ L. PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min 后, 94 $^{\circ}$ C 45 s、55 $^{\circ}$ C 45 s、72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min.

1.4 PCR 扩增产物的纯化、T-A 克隆及测序

PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离, 用凝胶回收试剂盒纯化后克隆至 pGEM-T easy 载体上, 连接产物按 CaCl₂ 转染法转化宿主菌 TOP10. 用含氨苄青霉素抗性的 LB 平皿筛选重组质粒, 碱裂解法提取质粒经 PCR 鉴定正确后送上海 Invitrogen 公司测序(测序引物为 M13 通用引物).

1.5 重组发光载体的构建

分别以测序正确的 pT-*uvrA* 载体、pT-*alkA* 载体为模板, 扩增 *uvrA*、*alkA* 片段, 用 *BamH* I、*EcoR* I 双酶切; PUCD615 载体也用该 2 种酶进行双酶切. 酶切产物纯化后, 用 DNA Ligation Kit Ver. 2.0 连接试剂盒, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜. 连接体系中, 载体与插入片段的摩尔比为 1:5~1:10, 连接产物电转化(1 500 V、25 μ F、200 Ω)导入宿主菌 JM109. 迅速加入 1 mL SOB, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h, 涂布于含氨苄青霉素和卡那霉素平板上, 过夜观察. 重组子为 PUCD-*uvrA*、PUCD-*alkA* (图 1).

1.6 重组发光载体中外源基因整合的 PCR 检测及测序鉴定

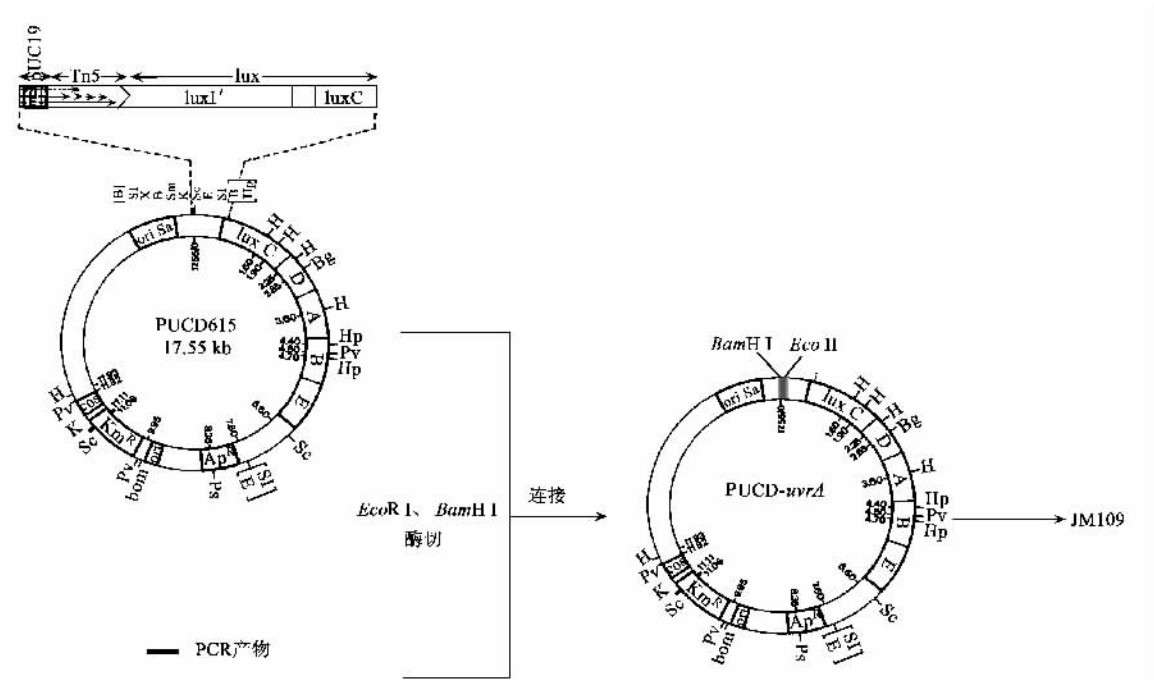


图 1 重组发光载体 PUCD-uvrA 的构建

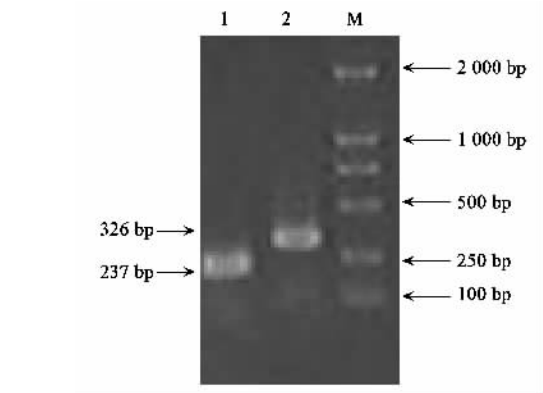
Fig.1 Construction of recombinant vector PUCD-uvrA

挑取平皿上克隆至 Amp^+ 、 Km^+ 的 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养过夜. 碱裂解法提取质粒进行 PCR 鉴定正确后送上海 Invitrogen 公司测序. 测序引物为 *uvrA*、*alkA* 的特异性引物, 测序结果上 GenBank 中进行序列比对.

2 结果与讨论

2.1 PCR 扩增

PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 如图 2 所示: *uvrA* 片段为 237bp, *alkA* 片段为 326 bp, 均与预期大小相符(图 2).



1: *uvrA*; 2: *alkA*; M: Marker (DL2000)

图 2 *uvrA*、*alkA* 片段的 PCR 结果

Fig.2 Amplified product of *uvrA* and *alkA* by PCR

2.2 pT-uvrA、pT-alkA 重组载体的 PCR 鉴定

从 Amp^+ 平皿上各挑取 8 个 pT-*uvrA*、pT-*alkA* 载体的转化子, 直接进行菌落 PCR 鉴定. 除 pT-*uvrA* 连接的克隆 3, 其余克隆均为阳性克隆(图 3). 直接挑克隆进行菌落 PCR 鉴定的优点是快速, 可省去摇菌提质粒、酶切等操作, 提高效率. 只要 PCR 产物纯化的程度、浓度较高, 含量达到 50 ng 以上, 连接 T 载体后的阳性克隆比例通常非常高.

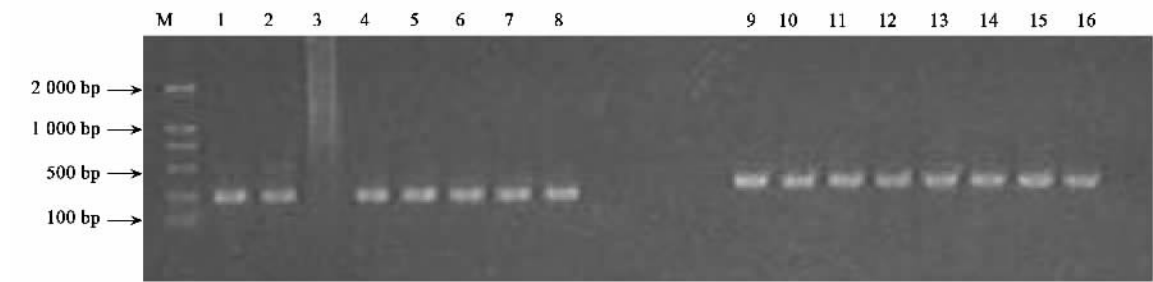
2.3 pT-uvrA、pT-alkA 重组载体的测序鉴定

将 PCR 鉴定为阳性的 pT-*uvrA*、pT-*alkA* 重组载体克隆送上海 Invitrogen 公司测序, 结果与 GenBank 中 *uvrA* (M13495.1)、*alkA* (K02498.1) 序列进行比对, 同源性均为 99%, 高度同源, 表明扩增序列正确. 测序所用引物为 M13 通用引物的上游序列 M13F, 图 4(a) 为 *uvrA* 比对图, 图 4(b) 为 *alkA* 比对图. 图中 UVRA. M13F、ALKA. M13F 为 pT-*uvrA*、pT-*alkA* 重组载体中 *uvrA*、*alkA* 序列, *uvrA*. origin、*alkA*. origin 为 GenBank 中 *uvrA* (M13495.1)、*alkA* (K02498.1) 序列.

2.4 PUCD-uvrA、PUCD-alkA 重组载体的 PCR 鉴定

从 Amp^+ 、 Km^+ 双抗性的 LB 平皿上各挑取 2 个克隆, 用直接菌落 PCR 鉴定效果很差, 这可能和重组载体较大, 存在的菌体对 PCR 扩增有影响造成, 故用碱裂解法提取质粒后再进行 PCR 鉴定, 结果如

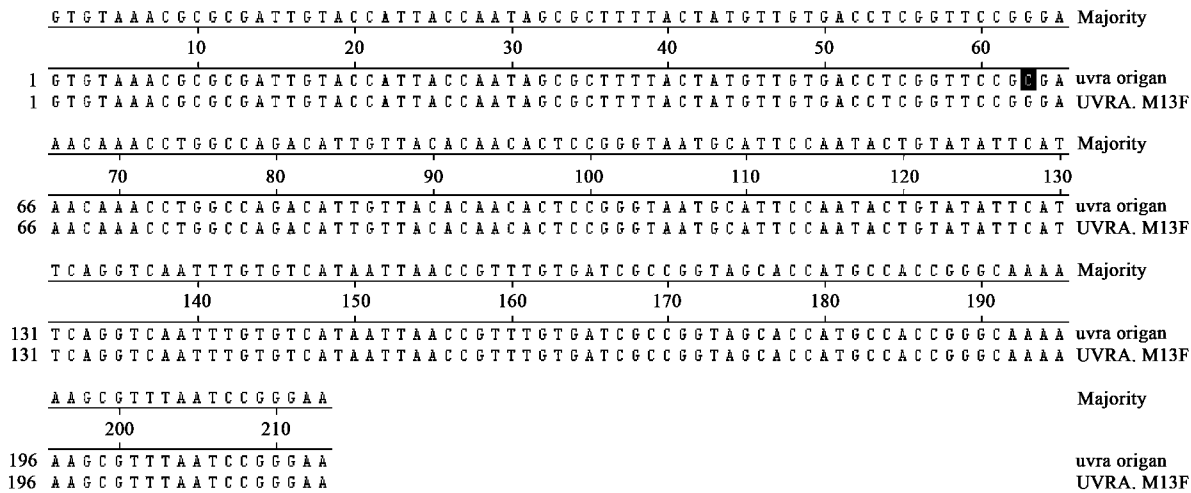
图 5 所示,均能在相应的位置扩出明亮条带,初步鉴定为阳性克隆.



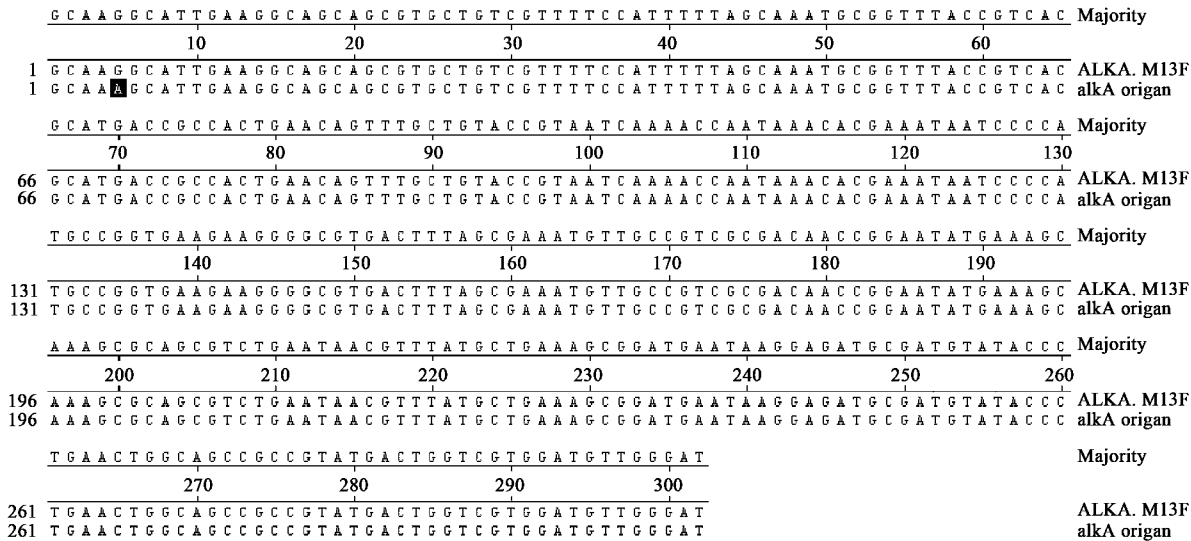
1 ~ 8: clones of pT-*uvrA*; 9 ~ 16: clones of pT-*alkA*; M: marker (DL2000)

图 3 pT-*uvrA*、pT-*alkA* 重组载体的 PCR 鉴定

Fig.3 Determination of pT-*uvrA* and pT-*alkA* recombinant vectors by PCR



(a) pT-*uvrA*



(b) pT-*alkA*

图 4 pT-*uvrA*、pT-*alkA* 重组载体测序比对结果

Fig.4 Comparing sequence of pT-*uvrA*, pT-*alkA* recombinant vectors

含 *luxCDABE* 的质粒 pUCD615 全长 17.55 kb, 而插入的基因片段长度大约 300 bp 左右, 连接片段长度差别悬殊, 给选用合适的连接比例带来困难, 也增加了重组载体构建及转化的难度. 经过多次尝试, 获得合适的连接比例: 载体与插入片段的摩尔比为 1:10. 同时连接时采用宝生物公司的 DNA Ligation Kit Ver. 2.0, 选用连接酶最稳定的温度 16℃ 连接过夜. 对于连接产物总长近 18kb, 大质粒的转化和复制难度较大的问题, 本研究采用电转化方法, 并且选择繁殖相对稍慢的宿主菌 JM109, 以利于大质粒的容纳和拷贝. 通过上述方法, 顺利将酶切后的片段与 PUCD615 连接及转化成功.

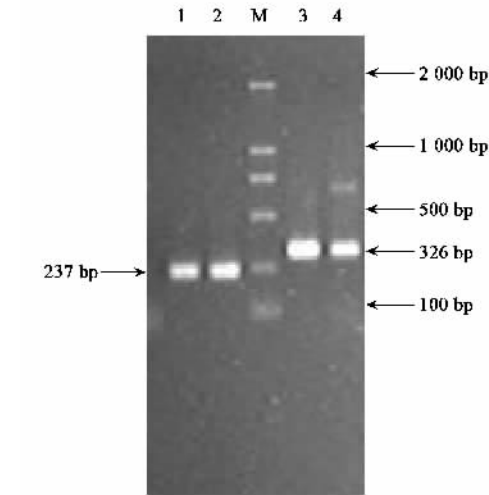
被切掉外, PUCD-*uvrA* 载体与 pT-*uvrA* 载体上的 *uvrA* 序列完全相同. 下游与载体序列相接的部位准确的出现 *EcoR* I 和 *Sal* I 的酶切位点, 这是 PUCD615 载体多克隆位点(mcs)下游的酶切位点. 表明 *uvrA* 基因已方向、位置正确的插入到 PUCD615 的多克隆位点, PUCD-*uvrA* 重组载体构建成功[图 6(a)].

PUCD-*alkA* 重组载体用下游引物测序, 也测一个反应. 结果表明, 序列由 *alkA* 基因及 PUCD615 载体多克隆位点上游的 *oriSa*(质粒 pSa 的复制起点) 基因组成. 与 pT-*alkA* 载体中的 *alkA* 基因比对表明 *alkA* 序列上游与载体序列相接的部位准确的出现 *Sal* I、*Xba* I、*Bam*H I 的酶切位点, 表明 *alkA* 基因已正确的插入到 PUCD615 的多克隆位点, 方向和读码框正确[图 6(b)].

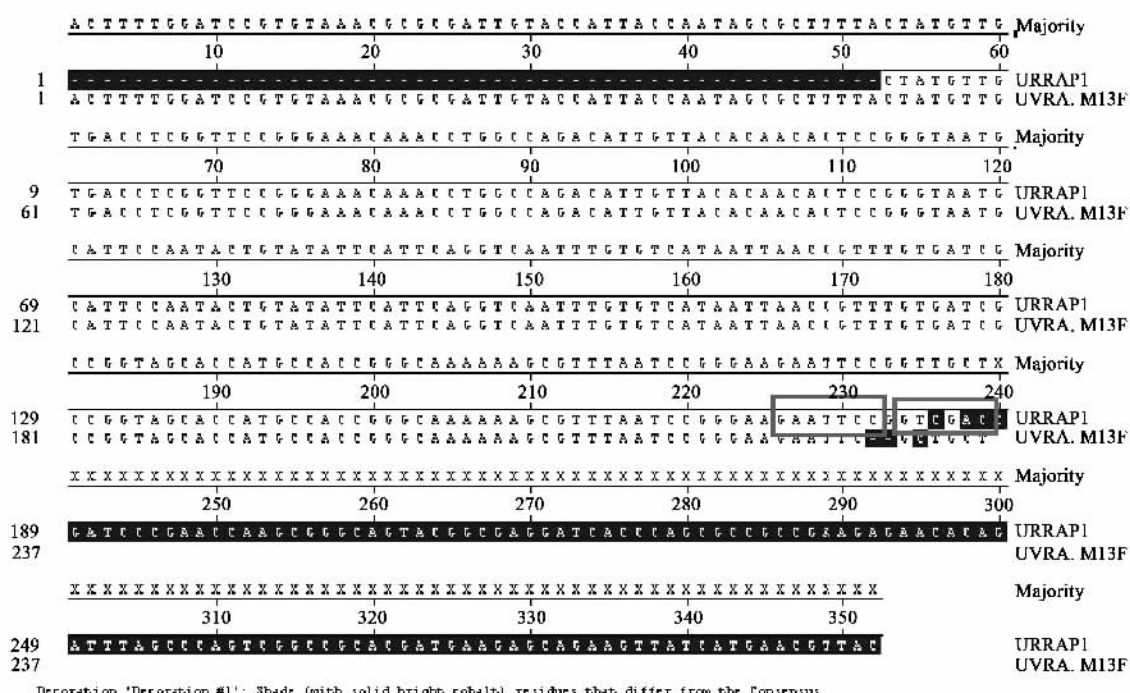
3 结论

- (1)从 W3110 中成功扩出 *uvrA*、*alkA* 基因片段, 长度分别为 237 bp、326 bp.
- (2)将 PCR 产物纯化连上 pGEM-T 载体后测序, 结果与 GenBank 中 *uvrA* (M13495.1)、*alkA* (K02498.1) 序列进行比对, 同源性均为 99%, 高度同源, 表明扩增序列正确.
- (3)对于片段长度悬殊很大的 PUCD615 载体和插入序列, 连接和转化较为困难. 经过多次尝试, 获得合适的连接比例: 载体与插入片段的摩尔比为 1:10. 连接时采用连接效果较好的宝生物公司的 DNA Ligation Kit Ver. 2.0, 选用连接酶最稳定的温度 16℃ 连接过夜. 转化时采用效率高的电转化方法, 并且选择繁殖相对稍慢的宿主菌 JM109, 以利于大质粒的容纳和拷贝.
- (4)PUCD-*uvrA*、PUCD-*alkA* 载体的初步鉴定不采用直接菌落 PCR 鉴定法, 而是提取相应克隆的质粒, 再进行 PCR 鉴定, 可取得很好效果.
- (5)PUCD-*uvrA*、PUCD-*alkA* 载体测序结果表明: *uvrA*、*alkA* 基因片段已经成功插入 PUCD615 载体多克隆位点(mcs), 插入的方向、位置正确, PUCD-*uvrA*、PUCD-*alkA* 重组载体构建成功.

2.5 PUCD-*uvrA*、PUCD-*alkA* 重组载体的测序鉴定
将 PCR 鉴定为阳性的克隆进行测序. PUCD-*uvrA* 重组载体用 *uvrA* 上游引物测一个反应, 结果表明序列由 *uvrA* 基因及 PUCD615 载体上多克隆位点(mcs)下游的 *Tn5* 基因和 *lux* 基因组成. 利用 CLUSTAL X 软件将其与 pT-*uvrA* 载体中的 *uvrA* 基因比对^[13], 结果表明除了上游少量序列由于测序原因



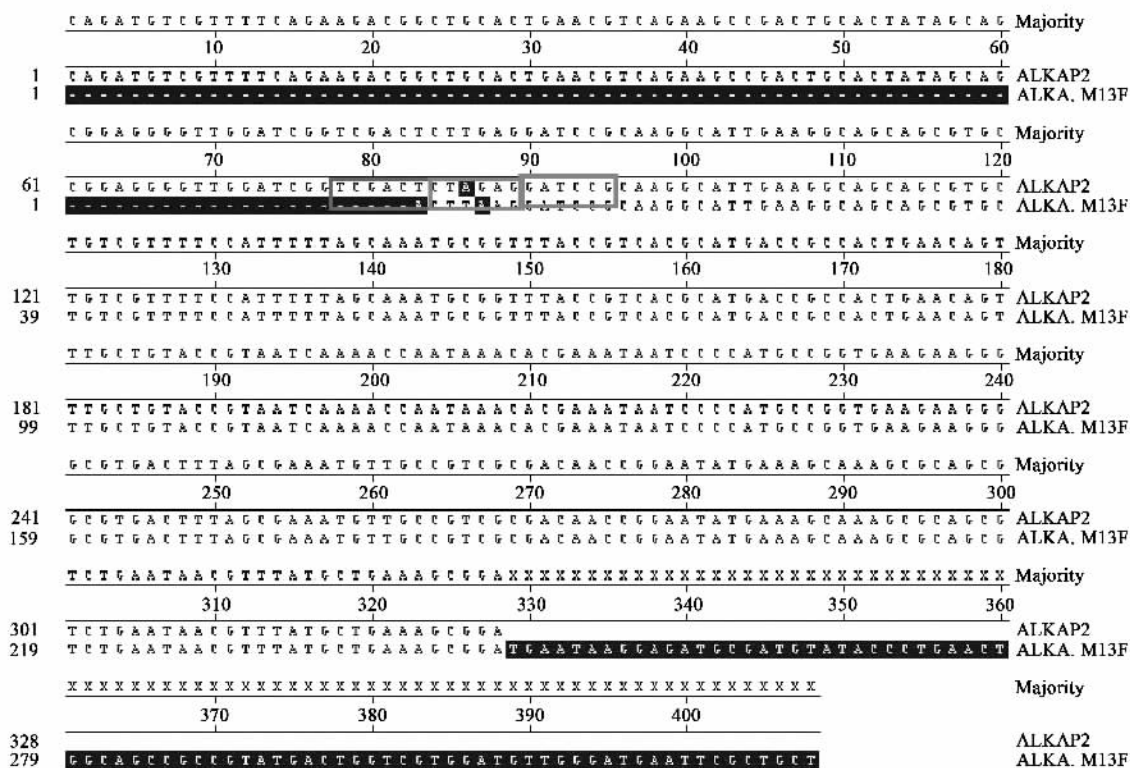
1, 2: clones of PUCD-*uvrA*; 3, 4: clones of PUCD-*alkA*;
M: marker (DL2000)
图 5 PUCD-*uvrA*、PUCD-*alkA* 重组载体的 PCR 鉴定
Fig.5 Determination of PUCD-*uvrA* and PUCD-*alkA* recombinat
vectors by PCR



Decoration 'Decoration #1': Shade (with solid bright cobalt) residues that differ from the Consensus



(a) PUCD-*uvrA*



Decoration 'Decoration \$I\$': Shade (with solid bright cobalt) residues that differ from the Consensus



(b) PUCD-*alkA*

图 6 PUCD-*uvrA*、PUCD-*alkA* 重组载体测序比对结果

Fig.6 Comparing sequence for PUCD-*urrA* and PUCD-*alkA* recombinant vectors

参考文献:

- [1] Applegate B M, Kehrmeier S R, Sayler G S. A chromosomally based *tdi-luxCDABE* whole-cell reporter for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) sensing [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, **64** (7): 2730-2735.
- [2] Hay A G, Rice J F, Applegate B M, *et al.* A bioluminescent whole-cell reporter for detection of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and 2, 4-dichlorophenol in Soil [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, **66**: 4589-4594.
- [3] Abd-El-Haleem D, Ripp S, Scott C, *et al.* A *luxCDABE*-based bioluminescent bioreporter for the detection of phenol [J]. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology, 2002, **29**(5): 233-237.
- [4] van Dyk T K, Majarian W R, Konstantinov K B, *et al.* Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat-shock gene-bioluminescence gene fusions [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, **60**(5): 1414-1420.
- [5] van Dyk T K, Wei Y, Hanafey M K, *et al.* A genomic approach to gene fusion technology [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, **98**(5): 2555-2560.
- [6] Belkin S, Smulski D R, van Dyk T K, *et al.* Detection of DNA damage by use of *Escherichia coli* carrying *recA'-lux*, *uvrA'-lux*, or *alkA'-lux* reporter plasmids [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, **63**(7): 2566-2571.
- [7] Belkin S, Smulski D R, Vollmer A C, *et al.* Oxidative stress detection with *Escherichia coli* harboring a *katG':::Lux* fusion [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, **62**(7): 2252-2256.
- [8] van Dyk T K, Smulski D R, Reed T R, *et al.* Responses to toxicants of an *Escherichia coli* strain carrying a *uspA':::Lux* genetic fusion and an *E. coli* strain carrying a *grpE':::Lux* fusion are similar [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, **61** (11): 4124-4127.
- [9] Mitchell R J, Gu M B. An *Escherichia coli* biosensor capable of detecting both genotoxic and oxidative damage [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2004, **64**(1): 46-52.
- [10] Norman A, Hansen L H, Sørensen S J. Construction of a ColD *cda* Promoter-Based SOS-Green Fluorescent Protein Whole-Cell Biosensor with Higher Sensitivity toward Genotoxic Compounds than Constructs Based on *recA*, *umuDC*, or *sudA* Promoters [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, **71**: 2338-2346.
- [11] Lee J H, Mitchell R J, Kim B C, *et al.* A cell array biosensor for environmental toxicity analysis [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2005, **21**: 500-507.
- [12] 茆灿泉, 杨树德. 发光细菌 *lux* 报告基因系统的评价及应用 [J]. 微生物学通报, 2000, **27**(4): 297-299.
- [13] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Res, 1997, **25** (24): 4876-4882.