

遗传稳定型六六六、甲基对硫磷降解基因工程菌的构建及特性研究

陆鹏¹, 洪源范¹, 洪青^{1,2*}, 蒋新², 李顺鹏¹

(1. 南京农业大学生命科学学院农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095; 2. 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)

摘要:通过转座子介导同源重组的方法, 将甲基对硫磷水解酶基因 *mpd* 导入到六六六降解菌 BHC-A 的染色体上, 构建了能同时降解六六六和甲基对硫磷的基因工程菌 BHC-A-*mpd*. 对其生长特性和降解特性的研究表明, 工程菌在 LB 培养基中的生长特性与原始菌株没有差别, 生长至对数期 $A_{600\text{ nm}}$ 值都可达到 2.5; 对六六六的降解特性和原始菌株相同, 可在 10 h 内将 5 mg/L 的六六六完全降解. *mpd* 基因在 BHC-A-*mpd* 中稳定表达, BHC-A-*mpd* 可以降解多种有机磷类农药. 该基因工程菌的构建为六六六和甲基对硫磷复合污染环境的生物修复奠定了基础.

关键词:六六六; 甲基对硫磷; 生物降解; 基因工程菌

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)07-1973-04

Construction of a Stable Genetically Engineered Microorganism for Degrading HCH & Methyl Parathion and Its Characteristics

LU Peng¹, HONG Yuan-fan¹, HONG Qing^{1,2}, JIANG Xin², LI Shun-peng¹

(1. Key Laboratory of Microbiological Engineering Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract: A GEM designated as BHC-A-*mpd*, capable of simultaneously degrading of methyl parathion (MP) and HCH was successfully constructed by random insertion of a methyl parathion hydrolase gene (*mpd*) into chromosome of a HCH-degrading strain BHC-A with the mini-Tn-transposon system. The growth and degrading characteristics of BHC-A-*mpd* was compared with the original strain BHC-A, and the result showed that there was no difference in this two aspects, $A_{600\text{ nm}}$ of BHC-A-*mpd* in LB medium could reach 2.5 in logarithmic period, which was the same as that of the original strain BHC-A. BHC-A-*mpd* showed the same HCH-degrading ability as BHC-A and could degrade 5 mg/L of γ -HCH in 10 h. BHC-A-*mpd* showed high genetica stability and could degrade many kinds of organophosphorus pesticides. All these results indicated that BHC-A-*mpd* was a promising GEM in bioremediation of MP and HCH co-contaminated environment.

Key words: HCH; methyl parathion (MP); biodegrading; genetically engineered microorganisms

六六六 (HCH) 是一种脂溶性的有机氯农药. 它主要有 α 、 β 、 γ 、 δ 4 种立体异构体, 其中 γ 异构体具有杀虫效力^[1]. 虽然从 20 世纪 80 年代以后, 大部分发达国家和部分发展中国家已禁止使用六六六, 但由于其半衰期长, 目前仍是国内外环境部门监控的主要对象. 有机磷农药是继六六六以后的又一种主要农用杀虫剂, 甲基对硫磷是其主要品种之一. 它在为农业生产提供高效杀虫性能的同时也带来了严重的负面影响. 残留在土壤中的有机磷农药不仅会减弱土壤的正常生产能力, 还会对人类的健康造成危害^[2]. 微生物降解是一种环境友好型污染物去除方式. 科研人员已分离到六六六降解菌株^[3~6]和甲基对硫磷降解菌株^[7~14], 并且克隆了甲基对硫磷水解酶基因 *mpd*^[15~18], 但是还没有分离到能同时降解甲基对硫磷和六六六的菌株. 通过基因工程的手段可

以在菌株中引入新的降解性状, 增加降解菌的功能, 降低生产和使用成本, 为污染环境生物修复提供优良菌株^[4]. 本研究将编码甲基对硫磷水酶的基因 *mpd*^[15], 通过基因工程的手段导入六六六高效降解菌 *Sphingomonas* sp. BHC-A (BHC-A)^[3], 构建 1 株具有降解六六六及有机磷农药双重功能的工程菌, 以为六六六和有机磷农药复合污染环境的生物修复奠定了基础.

收稿日期: 2007-07-26; 修订日期: 2007-09-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30400013); 江苏省科技厅项目 (BG2005322); 江苏省教育厅项目 (JHZD06-2); 中国博士后科学基金项目 (2005037747); 江苏省博士后科研计划项目

作者简介: 陆鹏 (1986~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为环境微生物学.

* 通讯联系人, E-mail: hongqingnjau@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 培养基与试剂

基础盐培养基(MSM, g/L): NaCl 1.00, NH₄NO₃ 1.00, K₂HPO₄ 1.50, KH₂PO₄ 0.50, MgSO₄•7H₂O 0.10, pH 7.0, 以农药作为碳源, 浓度视需要添加. LB 培养基(g/L): 酵母膏 5.00, 蛋白胨 10.00, NaCl 10.00(固体加 1.5% 的琼脂), pH 7.0.

1.2 菌株和质粒

菌株和质粒见表 1.

表 1 本研究中所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study		
菌株和质粒	特性	来源
BHC-A	六六六降解菌, Str ^r	本实验室
<i>Pseudomonas putida</i> DLL-1	MP 降解菌	本实验室
BHC-A- <i>mpd</i>	基因工程菌	本研究
<i>E. coli</i> SM10 (λ pir)	pUT-mini-Tn5 的宿主菌	本研究
<i>E. coli</i> HB101	pRK600 的宿主菌	本实验室
pRK600	三亲接合的辅助质粒, Cm ^r	本实验室
pUT-mini-Tn5	带有 mini-Tn5 的自杀性质粒, Km ^r	本实验室
pUT-mini-Tn5- <i>mpd</i>	带有 <i>mpd</i> 基因的 pUT-mini-Tn5	本研究

1.3 γ -HCH 的检测^[3]

取待测样品 1 mL, 按 1:4 的比例加入正己烷, 剧烈振荡 5 min, 静置分层, 收集上层有机相正己烷, 加入适量无水硫酸钠除水后, 取 1 μ L 气相色谱测定. 气相色谱条件: GC-14B, ECD 检测器, OV-225 毛细管柱(30 m $\times$ 250 μ m $\times$ 0.25 μ m), 柱温: 210 $^{\circ}$ C, 进样口温度: 250 $^{\circ}$ C, 检测器温度: 300 $^{\circ}$ C, 载气: N₂, 流速: 40 mL/min, 进样量: 1 μ L.

1.4 有机磷农药的检测^[13]

待测样品样 1 mL, 加入 5 mL 的二氯甲烷, 剧烈振荡 5 min, 静置分层后, 弃水相, 收集有机相二氯甲烷, 过无水硫酸钠柱, 在 UV-2401 PC 型分光光度计上进行检测, 根据各有机磷农药的特征吸收峰的峰值来计算有机磷农药的含量.

1.5 pUT-mini-Tn5-*mpd* 的构建

以 *Pseudomonas putida* DLL-1^[15] 的基因组为模板通过 PCR 扩增 *mpd* 基因表达盒(正向引物 P1: 5'-TA GCGGCCGCTCCGTCCAATCTCC-3' 反向引物 P2: 5'-TA GCGGCCGCTATCACTTGGGGTTG-3', (下划线标注为 *Not* I 酶切位点). 100 μ L 反应体系: 模板 1 μ L, 10 $\times$ *Taq* 缓冲液 10 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 6 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 8 μ L, *Taq* 酶(5 U/ μ L) 1 μ L, 超纯水 74 μ L. PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变

性 30 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 将 PCR 产物用 *Not* I 酶切后和经过同样酶切的 pUT-mini-Tn5 酶连后得到 pUT-mini-Tn5-*mpd*, 将该重组质粒转化至 *E. coli* SM10 (λ pir) 感受态细胞中, 涂布在含有卡那霉素(50 mg/L)、氨苄青霉素(100 mg/L)和甲基对硫磷(100 mg/L)的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 筛选阳性克隆 *E. coli* SM10 (λ pir)/pUT-mini-Tn5-*mpd*.

1.6 工程菌的构建

参照文献[19]进行三亲接合, 将供体菌 *E. coli* SM10 (λ pir)/pUT-mini-Tn5-*mpd*、辅助菌 *E. coli* HB101/pRK600、受体菌 BHC-A 分别在加有相应抗生素的 LB 液体培养基中培养至对数期. 取培养好的 3 种菌液各 3 mL, 10 000 r/min 离心, 并用 LB 液体培养基洗涤后重悬, 把混合菌液滴在 LB 固体平板表面的细菌滤膜(孔径 0.45 μ m)上, 30 $^{\circ}$ C 培养过夜, 用 LB 液体将菌体洗下, 取 50 μ L 涂布于含卡那霉素(50 mg/L)、链霉素(50 mg/L)和甲基对硫磷(100 mg/L)的 LB 平板上, 于 30 $^{\circ}$ C 培养后筛选阳性接合子.

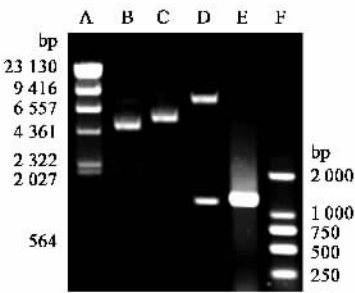
2 结果与讨论

2.1 pUT-mini-Tn5-*mpd* 的构建

以 *Pseudomonas putida* DLL-1 的基因组为模板通过 PCR 扩增出 *mpd* 基因表达盒, 并将它用 *Not* I 酶切后和经过同样酶切的 pUT-mini-Tn5 酶连后得到 pUT-mini-Tn5-*mpd*(图 1、图 2). 将该重组质粒转化至 *E. coli* SM10 (λ pir) 感受态细胞中, 按照 1.5 的方法筛选阳性克隆. 从图 3(b)中可以看出, 在阳性克隆 *E. coli* SM10 (λ pir)/pUT-mini-Tn5-*mpd* 周围出现了黄色的水解圈, 这是由于 *mpd* 基因编码的甲基对硫磷水解酶降解甲基对硫磷形成了黄色的对硝基酚^[15], 这表明 pUT-mini-Tn5-*mpd* 已经成功构建, *E. coli* SM10 (λ pir)/pUT-mini-Tn5-*mpd* 可以作为工程菌构建过程中的供体菌.

2.2 工程菌的构建

以 *E. coli* SM10 (λ pir)/pUT-mini-Tn5-*mpd* 作为供体菌、*E. coli* HB101/pRK600 作为辅助菌、BHC-A 作为受体菌进行三亲接合后得到了产生黄色的水解圈阳性接合子 BHC-A-*mpd*[图 3(c)], 表明 *mpd* 基因已经进入 BHC-A 中并得到了表达, 将 BHC-A-*mpd* 培养后, 进行质粒检测, 没有发现质粒, 证明自杀性质粒 pUT-mini-Tn5-*mpd* 确实不能在 BHC-A-*mpd* 中复制, 这同时也表明 *mpd* 基因是通过整合到 BHC-A 的染色体上而得到了基因工程菌 BHC-A-*mpd*.



A: DNA/*Hind*III Marker; B: pUT/mini-Tn5; C: pUT/mini-Tn5-*mpd*;
D: *Not* I 酶切 pUT/mini-Tn5-*mpd*

图 1 pUT/mini-Tn5-*mpd* 构建过程的电泳验证

Fig.1 Electrophoresis map of construction procedure of
pUT/mini-Tn5-*mpd*

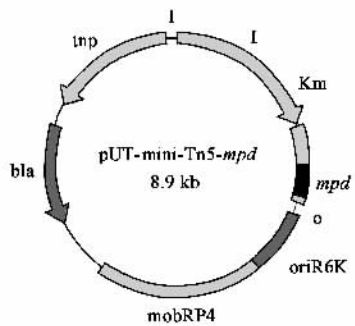
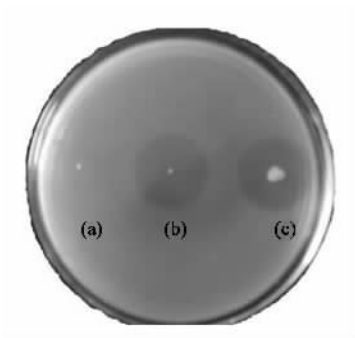


图 2 pUT-mini-Tn5-*mpd* 的质粒图谱

Fig.2 Map of plasmid pUT-mini-Tn5-*mpd*



(a): BHC-A; (b): *E. coli* SM10 (λ pir)/pUT-mini-Tn5-*mpd*; (c): BHC-A-*mpd*

图 3 受体菌、供体菌和工程菌的对甲基对硫磷的降解

Fig.3 Degradation of MP by recipient, donor and engineered strain

2.3 BHC-A-*mpd* 对六六六的降解

为了比较 BHC-A-*mpd* 和原始菌株 BHC-A 对六六六的降解特性,将 2 个菌株分别在 LB 培养基中培养至对数期,以 2% 接种量分别接入 γ -HCH 含量为 5 mg/L 的基础盐培养基中,30℃,180 r/min 摇床振荡培养,每隔 2 h 取 1 次样,按 1.3 方法检测 γ -HCH 的含量.从图 4 中可以看出, BHC-A-*mpd* 和 BHC-A 均

可在 10 h 之内将 5 mg/L 的 γ -HCH 降解完毕,而且降解速率也基本相同.这表明外源 *mpd* 基因的导入并没有影响到菌株原有的六六六降解性能.

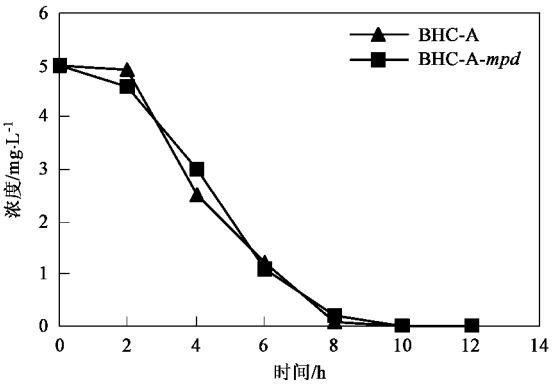


图 4 BHC-A-*mpd* 和 BHC-A 对 γ -HCH 的降解特性比较

Fig.4 Degradation of γ -HCH by BHC-A-*mpd* and BHC-A

2.4 BHC-A-*mpd* 对有机磷农药的降解

在液体 LB 中培养 BHC-A-*mpd*,取处于对数生长后期菌液,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入等体积的无菌水,按 5% 的接种量加入到含 100 mg/L 甲基对硫磷、辛硫磷、杀螟硫磷、对硫磷、甲拌磷、毒死蜱的基础盐培养基中,30℃、180 r/min 培养 48 h,取样 1 mL,按 1.4 方法检测,从图 5 中可以看出工程菌 BHC-A-*mpd* 对甲基对硫磷的降解率为 99.5%,和原始菌株 *Pseudomonas putida* DLL-1 相当^[15].对杀螟硫磷的降解率为 99.5%,对对硫磷的降解率为 88.5%,对辛硫磷、甲拌磷、毒死蜱的降解率相对低一些,只有 50% 左右.表明 *mpd* 基因已经整合到 BHC-A-*mpd* 的染色体上,表达出有活性的底物广谱性有机磷水解酶,能降解多种有机磷农药.

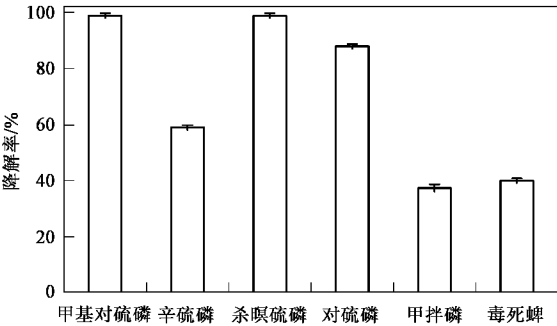


图 5 BHC-A-*mpd* 对不同有机磷农药的降解

Fig.5 Degradation of different organophosphorus pesticide by BHC-A-*mpd*

2.5 BHC-A 和 BHC-A-*mpd* 的生长特性比较

以 2% 的接种量将对数生长期的 BHC-A、BHC-A-*mpd* 种子液分别进入液体 LB 中,30℃,180

r/min摇床振荡培养,每隔4 h取样测定菌体的生长量,从图 6 中可以看出工程菌 BHC-A-*mpd* 和原始菌株 BHC-A 在 LB 培养基中生长生长曲线趋势相同,都成 S 型生长曲线,对数期 $A_{600\text{ nm}}$ 值都可达到 2.5 左右,由此可见,外源 *mpd* 基因的导入只是增加了原始菌株的功能,对其生长没有影响.

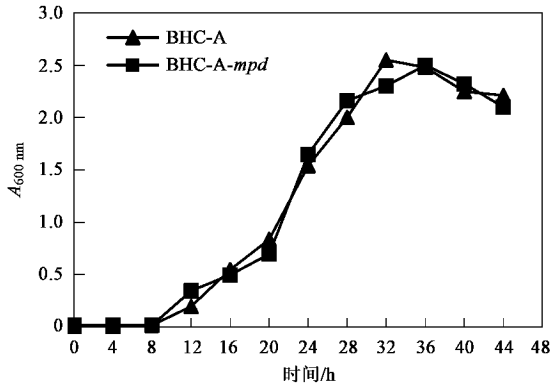


图 6 BHC-A-*mpd* 和 BHC-A 的生长特性比较

Fig.6 Growth curve of BHC-A-*mpd* and BHC-A in LB medium

2.6 工程菌 BHC-A-*mpd* 的稳定性研究

为了研究 *mpd* 基因在 BHC-A-*mpd* 中的遗传稳定性,将该菌株在 LB 平板和含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 平板上分别连续传接培养 100 次,然后分别随机挑取 50 个单菌落,测定它们对六六六和甲基对硫磷的降解特性,结果显示,所有的菌株都表现出相同的降解特性,表明 *mpd* 基因是通过同源重组整合到 BHC-A 的染色体上,并且得到了稳定表达.和以质粒为载体构建的基因工程菌相比^[20],在遗传稳定性方面表现出了独特的优越性.

3 结论

(1)构建了能同时降解六六六和多种有机磷农药的基因工程菌 BHC-A-*mpd*.

(2)BHC-A-*mpd* 除了增加了降解有机磷农药的功能以外,在生长和六六六降解特性方面和出发菌株 BHC-A 没有差别.

(3)*mpd* 基因在工程菌 BHC-A-*mpd* 中稳定表达,表现出遗传稳定性.

参考文献:

[1] Langenhoff A A M, Staps J J M, Pijls C G J M, *et al.* Intrinsic and stimulated *in situ* biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) [J]. *Water Air and Soil Pollut Focus*, 2002, **2**: 171-181.

[2] Carlock L L, Chen W L, Gordon E B, *et al.* Regulating and assessing risks of cholinesterase-inhibiting pesticides: divergent approaches and interpretations[J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health B*,

1999, **2**: 105-160.

[3] 马爱芝,武俊,汪婷,等.六六六(HCH)降解菌 *Sphingomonas* sp. BHC-A 的分离与降解特性的研究[J]. *微生物学报*, 2005, **45** (5): 728-732.

[4] Jean C T, Francoide B, Maurice J. Isolation and characterization of a novel γ -hexachlorocyclohexane-degrading bacterium[J]. *J Bacteriol*, 1996, **178**: 6049-6055.

[5] Kumari R, Subudhi S, Suar M, *et al.* Cloning and characterization of *lin* genes responsible for the degradation of hexachlorocyclohexane isomers by *Sphingomonas paucimobilis* strain B901[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 6021-6028.

[6] Nagata Y, Miyauchi K, Takagi M. Complete analysis of genes and enzymes for γ -hexachlorocyclohexane degradation in *Shingomonas paucimobilis* UT26 [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1999, **23**: 380-390.

[7] Zhang R F, Cui Z L, Jiang J D, *et al.* Diversity of organophosphorus pesticide-degrading bacteria in a polluted soil and conservation of their organophosphorus hydrolase genes[J]. *Can J Microbiol*, 2005, **51**: 337-343.

[8] Chaudhry G, Ali A N, Wheeler W B. Isolation of a metnlyl parathion-degrading *Pseudomonas* sp. that possesses DNA Homologous to the *opd* gene from a *Flavobacterium* sp. [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**(2): 288-293.

[9] 陈亚丽,张先恩,刘虹,等.甲基对硫磷降解菌假单胞菌 WBC-3 的筛选及其降解性能的研究[J]. *微生物学报*, 2002, **42**(4): 490-497.

[10] 沈雨佳,洪源范,洪青,等.辛硫磷降解菌 XSP-1 的分离、鉴定及其降解特性研究[J]. *环境科学*, 2007, **28**(12): 2833-2837.

[11] 崔中利,李顺鹏,何健.甲基一六零五降解菌 J5 的分离及其降解性状研究[J]. *农村生态环境*, 2001, **1**(3): 21-25.

[12] 江玉姬,邓优锦,刘新锐,等.一株能高效降解几种有机磷农药的菌株 JS018 的鉴定[J]. *微生物学报*, 2006, **46**(3): 463-466.

[13] 张忠辉,洪青,张国顺,等.杀螟硫磷降解菌 FDS-1 的分离鉴定及其降解特性研究[J]. *中国环境科学*, 2005, **25**(1): 52-56.

[14] Rani N L, Latithakumari D. Degradation of methyl parathion by *Pseudomonas putida*[J]. *Can J Microbiol*, 1994, **40**: 1000-1006.

[15] 刘智,洪青,徐剑宏,等.甲基对硫磷水解酶基因的克隆、分析与融合表达[J]. *遗传学报*, 2003, **30**(11): 1020-1026.

[16] Cui Z L, Li S P, Fu G P. Isolation of methyl parathion degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 4922-4925.

[17] Xie X P, Yan Y C, Liu P P. Isolation, degradation and characterization of methylparathion degradative strain L4 [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2006, **26**(10): 1637-1642.

[18] Yang C, Liu N, Guo X M. *et al.* Cloning of *mpd* gene from a chlorpyrifos-degrading bacterium and use of this strain in bioremediation of contaminated soil[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, **265**: 118-125.

[19] 刘智,洪青,徐剑宏,等.耐盐及苯乙酸、甲基对硫磷降解基因工程菌的构建[J]. *微生物学报*, 2003, **43**(5): 554-559.

[20] Liu Z, Hong Q, Xu J H, *et al.* Construction of a genetically engineered microorganism for degrading organophosphate and carbamate pesticides[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2006, **58**: 65-69.