

pUCD-*recA* 重组发光菌构建及对遗传毒性污染物响应作用

黄新新, 何苗*, 罗虹, 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. 本研究从分析污染物毒性损伤的机制出发, 构建新型 pUCD-*recA* 基因重组发光菌. 用 PCR 法从大肠杆菌 W3110 中扩增 *recA* 基因, 将其与 pGEM-T easy 载体连接后测序. 测序正确的 *recA* 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. 将构建成功的 pUCD-*recA* 载体转化入大肠杆菌 RFM443, 加入相应的遗传毒性污染物, 观察发光响应作用. 结果表明, *recA* 基因 PCR 扩增出的片段为 293 bp, 测序结果与 GenBank 中的 *recA* 序列进行 BLAST 比对, 同源性为 99%, 表明扩增序列正确. 与 pUCD615 载体连接后的测序结果表明, *recA* 基因已正确的插入到 pUCD615 的多克隆位点, 方向和读码框正确. 重组发光菌载体构建成功. 将构建好的重组载体转化入 RFM443 宿主菌, 加入遗传毒性污染物观察响应效果. 丝裂霉素 (MMC) 对 pUCD-*recA* 重组发光菌诱导效果最好. 0.01 mg/L 即可有很好的响应曲线; *N*'-甲基-*N*'-硝基亚硝基胍 (MNNG) 则在 50 ~ 100 mg/L 时可发挥最佳响应作用.

关键词: 重组发光菌; 遗传毒性; pUCD-*recA* 载体; 响应效应

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)06- -

Construction of the pUCD-*recA* Recombinate Luminescence Bacterium to Evaluate the Genotoxicity of Environment Pollutants

HUANG Xin-xin, HE Miao, LUO Hong, 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. A recombinant luminescence bacteria vector pUCD-*recA* was constructed to investigate the general toxicity of pollutants. The gene of *recA* amplified by PCR from W3110 was cloned into pGEM-T easy vector and sequencing. The correct PCR product and pUCD615 vector were digested with *Bam*H I、*Eco*R I, then be fused and imported into JM109 with electrotransformation. Several clones were selected and identified by PCR and sequencing. The result revealed that the length of the *recA* fragment was 293 bp. When it was sequenced and blasted with the *recA* in GenBank, the homology of the sequences reached 99% indicating the amplified result correct. The sequencing result of the fragment fused with pUCD615 revealed that the gene of *recA* had been inserted into the multiple clone site correctly, and the insert direction and reading frame were also exactly. Transforming the pUCD-*recA* vector to *E. coli* RFM443, then we added the genotoxic pollutants and observed the responding effect. The effect of MMC inducing the pUCD-*recA* strain was best with the dose only of 0.01 mg/L, while need the dosage of MNNG reached 50-100 mg/L.

Key words: recombinant luminescence bacterium; genotoxicity; pUCD-*recA* vector; responding effect

工业化的深入发展, 对环境带来的危害日趋严重. 为保障水环境的安全, 加强水质毒性监控尤为紧迫. 以发光细菌检测水质污染是目前国际上广泛认可而又较为先进的生物检测手段之一. 然而野生发光菌直接用来检测水质污染却存在诸多限制, 如对毒性物质特异性差、不易定性、培养条件苛刻导致发光不稳定等. 随着分子生物学的发展, 国外许多研究机构纷纷尝试对发光菌进行改造^[1~4], 通过基因工程技术将 *lux* 发光基因系统中的结构基因融合到特定的启动子下游, 导入其他非发光宿主细胞后, 形成重组发光细菌. 可以快速测定化学物质及环境污染物的毒性, 确定环境污染的程度以及进行环境质量

的评价.

在这些重组菌中尤以诱导型重组发光细菌受到越来越广泛的关注. 来自美国、以色列的 Van Dyk、Vollmer 和 Belkin 等^[5~9] 从 90 年代初即开始重组发光菌的研究. 构建了一系列重组发光细菌, 用于毒物检测. 2000 年, 以 DNA 损伤为目标, 研究者进一步优化了基因融合和调控技术^[10]. 韩国学者 Mitchell

收稿日期: 2008-07-05; 修订日期: 2008-12-05

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); 浙江省嘉兴市项目(2006AY2059)

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@tsinghua.edu.cn

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

等^[11]构建了容纳双质粒的重组发光细菌 ,用于同时检测具有遗传毒性和氧化性损伤的污染。

遗传毒性污染物由于其巨大危害而倍受关注 ,对这类污染物的识别和评价尤为重要。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。*recA* 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。质粒 pUCD615 是一种经多次改造的载体^[12] ,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。多克隆位点便于插入各类启动子 ,以满足不同的检测需求。该质粒具有氨苄青霉素、卡那霉素双抗性 ,且宿主范围宽 ,有利于重组体的筛选。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 ,解除阻遏蛋白的抑制 ,使下游的 *lux* 基因在 *recA* 的强启动作用下得以表达 ,发出荧光。

丝裂霉素 (MMC)、*N'*-甲基-*N'*-硝基亚硝基胍 (MNNG)为 2 种重要的遗传毒性污染物 ,本试验旨在分析 pUCD-*recA* 重组菌对这 2 种物质的响应作用。

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⁺、Kan⁺ ,美国 Tennessee 大学 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 RFM443 由美国 DuPont 研究与发展实验中心 Saari 教授惠赠、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 *Eco*R I、*Bam*H 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 ;丝裂霉素 (MMC)、*N'*-甲基-*N'*-硝基亚硝基胍 (MNNG)为 Roche 公司产品 ,其它试剂均为分析纯试剂。

水质毒性快速检测仪 ,型号 BHP9511 ,北京滨松光子技术股份有限公司生产。

1.2 *recA* 基因引物设计

利用 Primer Premier 5.0 软件 ,根据 GenBank 中 *recA* 的序列分别设计一对引物^[7] ,并在引物两端分别引入了限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I 的酶切点。

引物由宝生物工程(大连)公司合成 ,序列为 *recA* 引物 :5'-ACTTAAGGATCCAGAGAAGCCTGTCGGCAC -3' ;5'-AGCTTTGAATTCGCTTTCTGTTTGT-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(10 mmol/L)1 μ L ,MgCl₂(25 mmol/L)2 μ L ,上下游引物(20 pmol/ μ L)各 0.5 μ L ,Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)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 ,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(50 μ g/mL)抗性的 LB 平皿筛选重组质粒 ,直接挑取克隆经菌落 PCR 初步鉴定后送上海 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

以测序正确的 pT-*recA* 载体为模板 ,扩增 *recA* 片段 ,用 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切 ;pUCD615 载体也用这 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-*recA* (图 1)。

1.6 重组发光载体 PCR 初步鉴定及测序鉴定

挑取平皿上克隆至 Amp⁺、Kan⁺(各 25 μ g/mL)的 LB 液体培养基中 ,37 $^{\circ}$ C 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 *recA* 的特异性引物 ,测序结果上 GenBank 中进行序列比对。

1.7 重组发光菌对遗传毒性污染物 MMC 与 MNNG 的响应作用

pUCD-*recA* 转化入大肠杆菌 RFM443 构成重组发光菌。挑取单克隆 26 $^{\circ}$ C ,180 r/min 振荡过夜。培养 12~16 h ,取 0.5 mL 培养菌液(10⁹/mL)加入 0.5 mL SOB 培养液 ,26 $^{\circ}$ C 振荡 1 h ,加入相应浓度的 MMC 及 MNNG(浓度均为 mg/L) ,于 26 $^{\circ}$ C 诱导一定时间后上 BHP9511 水质毒性快速检测仪检测 ,纪录相对发光值。

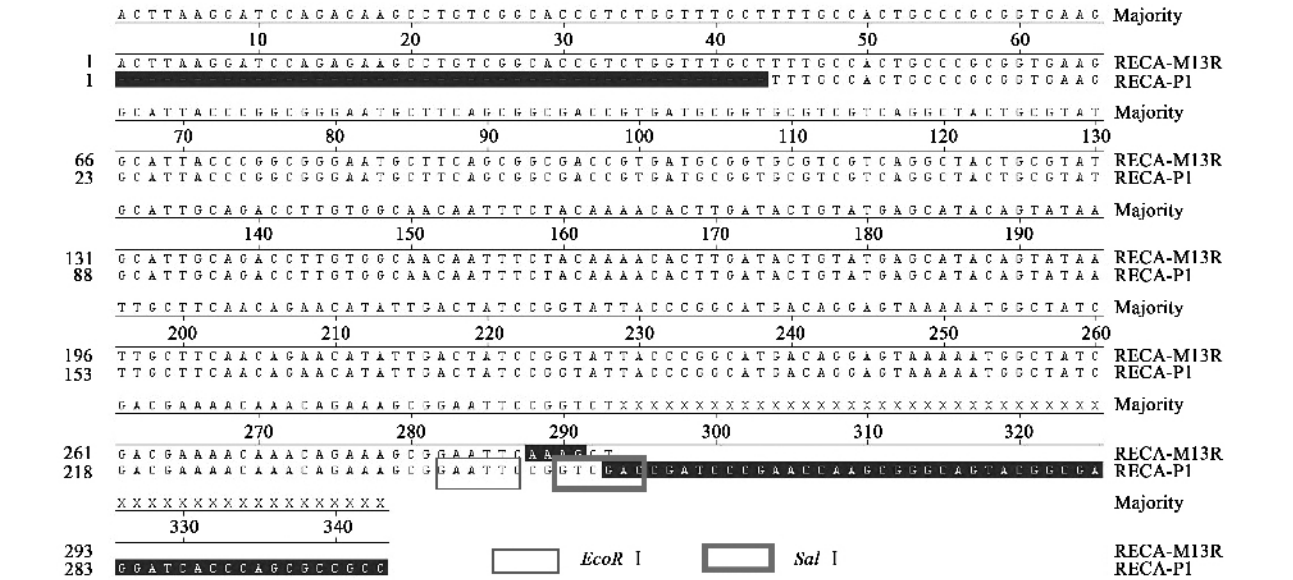


图 3 pUCD-*recA* 重组载体测序比对结果

Fig.3 Comparing sequence for pUCD-*recA* recombinant vector

pUCD-*recA* 菌株对这 2 种污染物均有明显的特异响应作用. pUCD-*recA* 菌株的本底发光值就很大,对 MMC 的反应尤为非常明显,作用 1 h 检测即有明显的吸光值.随着时间和浓度的递增相对吸光值迅速上升,浓度高于 1 mg/L 时,相对发光值都超出了仪器所能测量的界限(图 4).从 0.01 ~ 1 mg/L 多做几个浓度梯度,这种规律继续保持,0.01 mg/L 时响应效果即很明显(图 5).与其它^[7]对遗传毒性污染物敏感的重组发光菌相比,pUCD-*recA* 菌株对 MMC 的响应最为明显.

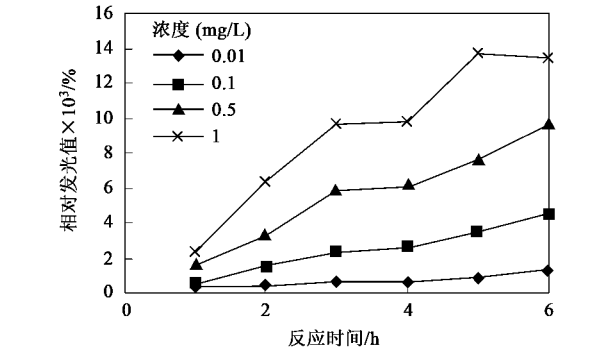


图 4 pUCD-*recA* 菌株对 MMC 的影响作用-1
Fig.4 Response effect-1 of pUCD-*recA* strain to MMC

pUCD-*recA* 菌株对 MNNG 响应的敏感性要稍弱于 MMC.作用 2 ~ 3 h 后,随着时间和浓度的递增逐渐上升,最佳响应浓度为 50 ~ 100 mg/L 后,随着浓度的上升到 200 ~ 400 mg/L 发光值迅速降低.因而对于

检测 MNNG,最佳浓度为 50 ~ 100 mg/L.相对发光值能持久上升相当长时间(图 6).并在反应到大约 22 h 时,发光值还在稳步上升(结果未显示).

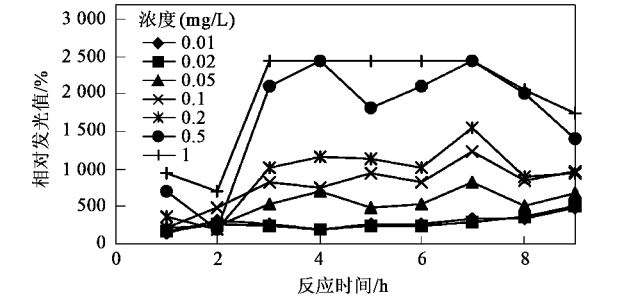


图 5 pUCD-*recA* 菌株对 MMC 的影响作用-2
Fig.5 Response effect-2 of pUCD-*recA* strain to MMC

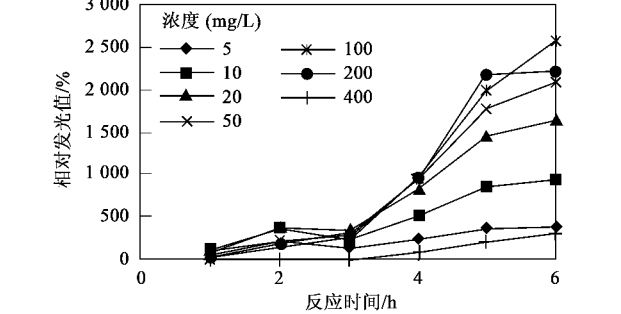


图 6 pUCD-*recA* 菌株对 MNNG 的响应作用
Fig.6 Response effect of pUCD-*recA* strain to MNNG

3 结论

(1)从 W3110 中成功扩出 *recA* 基因片段,长度

为 293 bp.

(2)将 PCR 产物纯化连上 pGEM-T 载体后测序 , 结果与 GenBank 中 *recA* 序列进行比对 , 同源性为 99% , 表明扩增序列正确.

(3)对于片段悬殊很大的 pUCD615 载体和插入序列 , 连接和转化较为困难. 需有合适的连接比例 , 并且片段的纯度和浓度足够高 , 达到 1 μL 50 ng 以上. 转化时采用效率高的电转化方法 , 为防止连接缓冲液中的离子浓度高而使电转化产生电弧影响转化效率 , 采用每次只加小量 (2 ~ 3 μL) 连接液入感受态细胞的做法可成功转化.

(4)pUCD-*recA* 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-*recA* 载体测序结果表明 : *recA* 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-*recA* 重组载体构建成功.

(6)pUCD-*recA* 菌株对遗传毒性污染物 MMC、MNNG 的响应明显 , 尤其对 MMC 只需 0.01 mg/L 即有很好的响应. 对 MNNG 的响应则需达到 50 ~ 100 mg/L.

参考文献 :

[1] Amin-Hanjani S. Luminescence-based Detection of Genetically Modified *Pseudomonas fluorescens* in Soil [D]. Ph. D. Thesis , University of Aberdeen , 1992.

[2] Rattray E A , Prosser J I , Killham K , *et al.* Luminescence-based nonextractive technique for in situ detection of *Escherichia coli* in soil [J]. Appl Environ Microbiol , 1990 , **56** (11) : 3368-3374.

[3] Ren S , Frymier P D. Toxicity of metals and organic chemicals evaluated with bioluminescence assays [J]. Chemosphere , 2005 , **58** (5) : 543-550.

[4] Iizumi T , Mizumoto M , Nakamura K. A Bioluminescence Assay Using *Nitrosomonas europaea* for Rapid and Sensitive Detection of Nitrification Inhibitors [J]. Appl Environ Microbiol , 1998 , **64** (10) : 3656-3662.

[5] 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]. Appl Environ Microbiol , 1994 , **60** (5) : 1414-1420.

[6] 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.

[7] Vollmer A C , Belkin S , Smulski D R , *et al.* Detection of DNA damage by use of *Escherichia coli* carrying *recA* ' -*lux* , *uurA* ' -*lux* , or *alkA* ' -*lux* reporter plasmids [J]. Appl Environ Microbiol , 1997 , **63** (7) : 2566-2571.

[8] Belkin S , Smulski D R , Vollmer A C , *et al.* Oxidative stress detection with *Escherichia coli* harboring a *katG* ' : *Lux* fusion [J]. Appl and Environ Microbiol , 1996 , **62** (7) : 2252-2256.

[9] 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]. Appl Environ Microbiol , 1995 , **61** (11) : 4124-4127.

[10] Davidov Y , Rozen R , Smulski R , *et al.* Improved bacterial SOS promoter ' : *lux* fusions for genotoxicity detection [J]. Genetic toxicology and environmental mutagenesis , 2000 , **46** (1) : 97-107.

[11] Mitchell R J , Gu M B. An *Escherichia coli* biosensor capable of detecting both genotoxic and oxidative damage [J]. Appl Microbiol Biotechnol , 2004 , **64** : 46-52.

[12] Rogowsky , Close P M , Chimera T J , *et al.* Regulation of the vir genes of agrobacterium tumefaciens plasmid pTiC58 [J]. Journal of bacteriology , 1987 , **169** (11) : 5101-5112.

[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.