

假单胞菌质粒抗汞基因的克隆

周桢林 陈 琦

(生物学系)

摘 要

采用pBR322为载体,将假单胞菌B-33抗汞质粒pBH33的抗汞基因,克隆至大肠杆菌C₆₀₀。在含25μg/ml四环素和30μg/ml HgCl₂的L-肉汤平板上生长的重组体中,筛选到一株能抗60μg/ml HgCl₂的抗汞基因克隆株——大肠杆菌C₆₀₀(pBH337)。重组质粒pBH337,经PstI酶解电泳分析和电镜观察表明,其分子量为6.1 kb,抗汞基因位于1.8kb长的PstI片段上。生长测定表明,克隆菌株可在含10μg/ml HgCl₂的L-肉汤中良好地生长,而受体大肠杆菌C₆₀₀则受到强烈抑制。汞挥发实验证明,抗汞基因克隆株C₆₀₀(pBH337),具有较强的去汞能力。

关键词 抗汞基因,假单胞菌,基因克隆

随着工业的发展,重金属汞对环境的污染越来越严重。然而,由于选择压力的结果,使许多微生物产生了抗汞能力。它们或是能建立透性障碍,阻止汞进入细胞^[1],或是能合成巯醇化合物并结合汞以降低其对细胞的毒害^[2],或是把无机汞转化为挥发性的甲基汞和二甲基汞,从环境中除去^[3],或是使汞离子还原成挥发性的金属汞除去,甚至还能还原有机汞^[4]。已知大多数抗汞细菌的抗汞能力是由于它们具有汞还原的各种酶^[5,6]。细菌的抗汞能力通常是由质粒上的基因编码的^[7]。因而人们已在尝试应用微生物处理含汞污水,这将成为防止汞污染,回收金属汞的有效方法^[8]。我们从污染地区分离出一株具抗汞质粒的假单胞菌B-33^[9],企图用基因重组技术选育治汞的工程菌,以pBR322为载体,从B-33菌抗汞质粒上克隆了抗汞基因,并进行了克隆菌株特性的研究。

1 材料与方 法

1.1 菌 株

假单胞菌Pseudomonas sp. B-33,具有抗汞质粒pBH33。大肠杆菌E. coli C₆₀₀。

1.2 培养基

L-肉汤培养基

1.3 质粒DNA的分离纯化

参照文献^[10]的方法,用碱裂解法提取质粒DNA得到粗品后,用4倍1 mol/l NaCl

以40000rpm离心6小时,得纯化的质粒DNA。

1.4 DNA酶切及连接反应

限制酶PstI、EcoRI、BamHI及 λ cl₈₅₇S₇ DNA为华美生物工程公司产品,限制酶Hind III为中国联合生物技术公司产品,T₄ DNA连接酶为中国医科院基础所产品。酶切和连接反应条件均按厂家提供。

pBH33及pBR322分别用PstI酶解,37℃反应1小时,将酶解液用酚-氯仿抽提1次,氯仿抽提1次,乙醇沉淀,离心收集DNA,溶于少量TE中。连接前将上述DNA于65℃水浴保温5分钟后混合,冷却后加入连接缓冲液及适量T₄ DNA连接酶,置12℃反应48小时,电泳检查连接结果,进行转化。

1.5 感受态细胞的制备及转化

参照文献^[11]进行。筛选重组子用含25μg/ml四环素及30μg/mlHgCl₂或100μg/ml氨苄青霉素的L-肉汤平板。

1.6 琼脂糖电泳及分子量测定

用1%琼脂糖平板凝胶电泳,以 λ cl₈₅₇S₇ DNA的Hind III酶切片段作为分子量标准,根据DNA片段在凝胶电泳中的迁移率与分子量的对数成反比的原理,估算未知DNA片段的分子量。

1.7 细菌生长测定

以2%的接种量将经活化后的C₆₀₀及C₆₀₀(pBH337)细胞分别接种于含10μg/mlHgCl₂的50ml L-肉汤中,37℃摇床培养。定时取样测OD₆₀₀。

1.8 汞挥发量的测定

将少量活化后的C₆₀₀和C₆₀₀(pBH337)分别接种于50ml L-肉汤中,37℃摇床培养至OD₆₀₀约为0.8时,加入HgCl₂至终浓度为5μg/ml,37℃培养70分钟后,再加HgCl₂至终浓度为10μg/ml。继续培养45分钟以诱导汞还原酶的生成。然后4000转/分离心15分钟,用等体积L-肉汤洗涤菌体除去残留的HgCl₂,将细胞转入含10ml肉汤的250ml锥形瓶内,混合后加入HgCl₂使终浓度为15μg/ml,立即取出1ml作对照,并加入1滴10N HNO₃使汞盐稳定,细胞置37℃振荡培养,定时取样。样品用原子吸收光谱法测定总汞含量^[12]。

1.9 电镜观察

参照文献^[13]的方法制片,用日立Hu-12A型电镜观察并照相,用地图仪描述DNA分子的轮廓周长。

2 结果与讨论

2.1 抗汞基因的克隆

已知假单胞菌B-33的抗汞基因,在质粒pBH33上并具有两个Pst I切点。用Pst I

酶解pBH33及pBR322, T₄ DNA连接酶连接, 重组质粒转化受体菌大肠杆菌C₆₀₀。在含25μg/ml四环素及30μg/ml HgCl₂的L-肉汤平板上, 筛选双抗转化子, 并复点至含100μg/ml氨苄青霉素的L-肉汤平板上, 获得对氨苄青霉素敏感而能抗四环素及HgCl₂的重组体14个。

将重组体分别在汞浓度不同的L-肉汤平板上培养, 获得1株抗性水平较高, 能在含60μg/ml HgCl₂的L-肉汤平板上生长良好的菌株。经质粒快速检测, 发现带有比载体pBR322较大的重组质粒, 命名为大肠杆菌C₆₀₀(pBH337)。

2.2 重组质粒的酶解和电泳分析

提纯后的重组质粒pBH337 DNA, 用Pst I酶解进行电泳, 结果如图1。pBH337经Pst I酶解后在电泳胶上可看到大小两条带, 大的与线状pBR322相同, 小带应是被克隆的含抗汞基因片段, 其长度约为1.8 kb。

2.3 重组质粒的再转化

为进一步鉴定克隆的抗汞基因, 将重组质粒pBH337再转化大肠杆菌C₆₀₀。随机挑取在含25μg/ml四环素和50μg/ml HgCl₂的L-肉汤平板上长出的菌落, 作质粒快速检测, 进行凝胶电泳分析, 结果如图2所示。从图2可见, 随机挑取的双抗转化体质粒与重组质粒pBH337相同, 表明再转化体的汞抗性来自于pBH337。

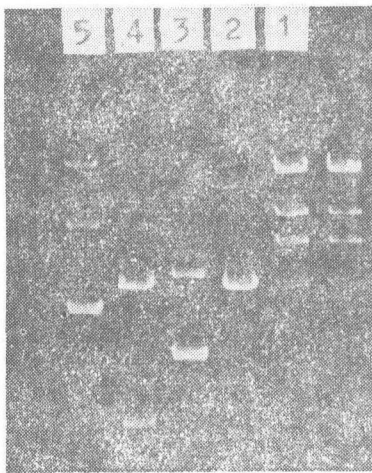


图1 重组质粒pBH337的电泳分析

Fig.1 Electrophoresis analysis of recombinant plasmid pBH337

1. λCI857S7/Hind III
2. pBR322/Pst I
3. pBR322
4. pBH337/Pst I
5. pBH337

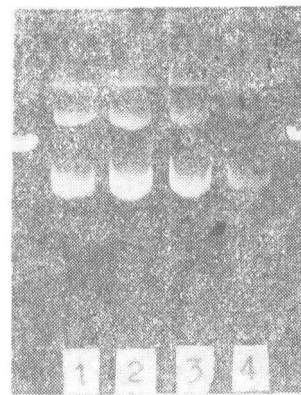


图2 再转化的质粒pBH337的电泳图

Fig.2 Gel electrophoresis of phasmid pBH337

1. pBH337
- 2~4. 再转化的质粒DNA

2.4 抗汞基因克隆菌株在含汞培养基中的生长测定

在含10μg/ml HgCl₂的L-肉汤中, 分别接种2%的克隆株C₆₀₀(pBH337)及受体C₆₀₀的过夜培养物, 37℃振荡培养, 定时取样测定OD₆₅₀, 作出生长曲线如图3、4。

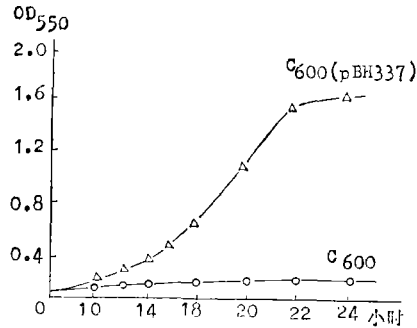
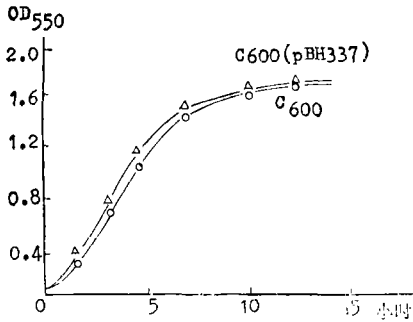


图3 $C_{600}(pBH337)$ 和 C_{600} 在无 Hg^{2+} 下的生长

图4 $C_{600}(pBH337)$ 和 C_{600} 在 $10\mu g/ml$ $HgCl_2$ 下的生长

Fig. 3 Growth of $C_{600}(pBH337)$ and C_{600} in the absence of Hg^{2+}

Fig.4 Growth of $C_{600}(pBH337)$ and C_{600} in the presence of $10\mu g/ml$ $HgCl_2$

Δ $C_{600}(pBH337)$ \circ C_{600}

Δ $C_{600}(pBH337)$ \circ C_{600}

由图中可看出,在不含汞情况下,两菌株的生长曲线很相似,但在含 $10\mu g/ml$ $HgCl_2$ 时,受体 C_{600} 受到强烈抑制,而抗汞基因克隆株 $C_{600}(pBH337)$,尽管适应期延长10小时左右,但仍能良好生长。据文献^[14]报导,这种适应期延长,对数生长期推迟,但生长速率不变的情况是因为细菌在还原汞离子时,生长速率很小,只有当汞被除去后,其生长速率才得以恢复。

2.5 抗汞基因克隆株 $C_{600}(pBH337)$ 的汞挥发测定

将经诱导的抗汞基因克隆株 $C_{600}(pBH337)$ 及 C_{600} ,分别移至含 $15\mu g/ml$ 汞离子的L-肉汤中,置 $37^\circ C$ 振荡培养,定时取样测定样品中汞总含量,结果列于表1。从表1可知,在处理180分钟后,克隆株 $C_{600}(pBH337)$ 培养物的汞离子含量,即自 $18.88\mu g/ml$ 下降至 $7.2\mu g/ml$,汞去除率达 61.86% ,然而受体 C_{600} 的去汞率仅为 19% ,克隆株 $C_{600}(pBH337)$ 的去汞率是 C_{600} 的 3.2 倍。据报导^[15],大多数抗汞细菌具有汞还原系统,经诱导后生成的汞还原酶,能将汞离子还原成金属汞,以汞蒸气形式从培养基中除去,导致培养物中汞总含量的下降。由此可见,克隆菌株 $C_{600}(pBH337)$ 具有还原汞离子的能力,重组质粒含有抗汞基因。

表1 $C_{600}(pBH337)$ 和 C_{600} 的汞挥发测定

Tab. 1 Mercury volatility of strains $C_{600}(pBH337)$ and C_{600}

菌株	处理时间 (min)	处理前 $Hg^{2+}(\mu g/ml)$	处理后 $Hg^{2+}(\mu g/ml)$	汞去除率 (%)
$C_{600}(pBH337)$	60		16.54	12.39
	120	18.88	9.74	48.41
	180		7.20	61.86
C_{600}	120		12.68	15.75
	180	15.05	12.10	19.6

2.6 重组质粒的电镜观察

经提纯并稀释后的质粒DNA样品，在电镜下观察到环状DNA分子并照相如图5、6。根据经验公式计算得知pBH337的分子量为 4.11×10^6 道尔顿，约为6.1kb，与电泳法测定的结果相符。

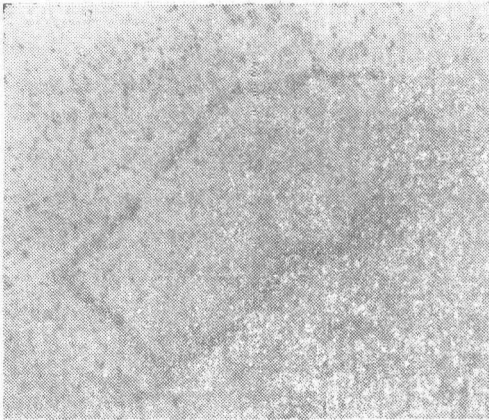


图5 pBR322电镜照片

Fig.5 EM of plasmid pBR322
($\times 90000$)

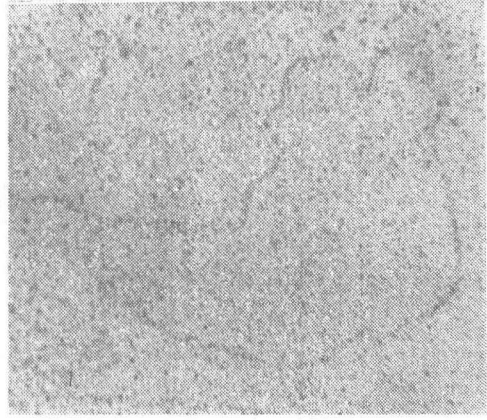


图6 pBH337电镜照片

Fig.6 EM of plasmid pBH337
($\times 80000$)

2.7 克隆片段的酶切分析

用4种限制性内切酶EcoR I、BamH I、Hind III及Pvu II，分别酶解重组质粒pBH337，1%琼脂糖电泳如图7。结果表明，pBH337被EcoR I、BamH I或Hind III切割后均成一条带，说明该重组质粒上仅有上述各酶切点各1个。已知载体pBR322上具有上述3种酶的切点各1个，可推知在克隆片段上没有这3种酶的切点。Pvu II可将pBH337切割成3个片段，大小依次为2.8kb、2.3kb及1.0kb，由于已知pBR322上具有1个Pvu II切点，则克隆片段上应有2个Pvu II切点。又Pvu II与Pst I可将pBR322切成2.7kb和1.6kb 2个片段，因此Pvu II将重组质粒pBH337，切割成3个片段中的最小的1.0kb片段，应来自于克隆片段上，克隆片段的其余两部分与pBR322的2.7kb和1.6kb片段分别组成2.8kb和2.3kb片段。故推知Pvu II可将克隆片段切割成大小依次为1.0kb、0.7kb及0.1kb 3个片段。

由于克隆片段上没有Hind III、EcoR I及BamH I酶切位点，可利用这些酶将其它一些有用的抗性基因（如其它重金属基因）克隆至pBH337上，可望获得多抗性的重组菌株。

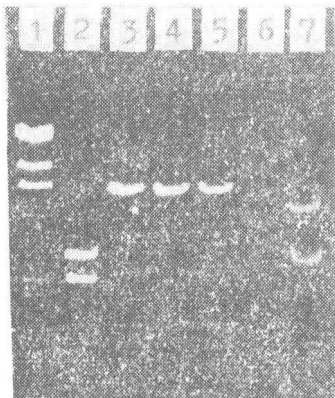


图7 克隆片段的四种酶切分析

Fig.7 restriction endonuclease analysis
of Cloned fragment

1. λ cI₈₅₇S₇/Hind III
2. pBH337/pvu II
3. pBH337/BamHI
4. pBH337/Hind III
5. pBH337/EcoRI
6. pBH337
7. pBR322

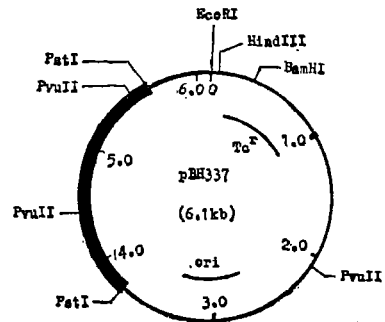


图8 克隆片段酶切分析

Fig.8 Restriction endonuclease analysis of
cloned fragment

参考文献

- [1] Bun-ichiro Ono et al., *J. Bact.*, 170(1988),12, 5877~5882
- [2] Pan-Hou H S K et al., *Arch. Micro.*, 129 (1981), 49~52
- [3] Wood J M et al., *Science*, 183 (1974), 1049~52
- [4] Clark D L et al., *J. Bact.*, 132 (1977), 186~196
- [5] Loutit J S et al., *Genet Res.*, 16 (1970), 179~184
- [6] Lisa M Shewchuk et al., *Biochem.*, 28 (1989), 2331~2339
- [7] Kondo I et al., *J. Bacteriol.*, 117 (1974), 1, 1~7
- [8] Conly L Hanse et al., *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXVI(1984), 1330~1333
- [9] 周楨林等, 中山大学学报(自然科学版), 1987,2, 35~40
- [10] Maniatis T et al., *Molecular Cloning*, 1982
- [11] Dagert M et al., *Gene*, 6(1979), 23~28
- [12] Hatch W R and W L Ott, *Anal. Chem.*, 40(1968), 2085~2087
- [13] Lang D, *J. Mol. Biol.*, 54 (1970), 557~565
- [14] Meissner P S et al., *J. Bact.*, 157(1984), 669~672
- [15] Robinson J B et al., *Microbiol. Rev.*, 48(1984), 2, 95~124

Cloning of the Hg-resistance Gene from the Plasmid pBH33 of *Pseudomonas* sp.

Zhou Zhenlin* Chen Qi

Abstract

The Hg-resistance gene from the plasmid pBH33 of *Pseudomonas* sp. B-33 has been cloned in *E. coli* C₆₀₀ using PstI digested plasmid pBR322 as vector. The molecular weight of the recombinant plasmid pBH337 was estimated to be about 6.1 kb according to EM and gel electrophoresis. The cloned gene located on a 1.8 kb PstI fragment of the plasmid pBH33 by restriction fragment analysis of the recombinant plasmid pBH337. Re-transformation suggested that the Hg-resistance gene was located on pBH337. Determination of growth showed that the recombinant C₆₀₀ (pBH337) with Hg-resistance gene could grow very well in L-broth containing 10ug/ml HgCl₂ and control C₆₀₀ had strongly been repressed. The mercuric volatile of C₆₀₀(pBH337) was also markedly higher than that of the control C₆₀₀.

Keywords Hg-resistant gene, *Pseudomonas*, gene cloning

* Department of Biology