

假单胞菌中抗汞质粒pBH33的分离与鉴定*

周楨林 罗进贤 李镇林 胡晋新

(生物学系)

摘 要

从污染环境分离出一株抗 $100\mu\text{M}$ HgCl_2 的假单胞菌B-33。经试验证实,假单胞菌B-33具有汞盐抗性质粒,定名为pBH33质粒,其分子量约为 7.24×10^6 道尔顿。

关键词 抗汞质粒,假单胞杆菌,限制性内切核酸酶。

在自然选择中,一些生物、特别是某些细菌,产生了抵抗汞等重金属能力^[1]。少数厌氧的产甲烷细菌(*Methanogenic bacteria*)^[2,3]及匙形梭菌(*Clostridium cochlearium*)^[4]等能将汞离子转变为甲基汞和二甲基汞等加剧了汞害;而许多大肠杆菌(*Escherichia coli*)^[5-7]、假单胞菌(*Pseudomonas*)^[8,9]、芽孢杆菌(*Bacillus*)^[10]、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)^[11,12]、氧化铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*)^[13]以及瘰癧分支杆菌(*Mycobacteria scrofulaceum*)^[14]等却能将汞离子还原为金属汞继而升华逸散,甚至还能将各种有机汞化合物分解然后再被还原^[15-17],具有解汞作用。而某些细菌的抗汞能力可能是由于对汞离子的结合和吸收^[18,19]。已知细菌抗汞能力通常是由质粒上的基因编码的^[20,21],且大多与抗生素及其它重金属砷、镉、锌、铜、铅、铋、锑等抗性基因连锁^[22-28]。若将能使汞离子还原蒸发或与汞离子结合的有关基因克隆转入合适受体,提高细菌对汞离子的还原或结合能力用以处理含汞废水,这是减少环境污染、净化水域的一条安全、有效的途径,同时还可回收金属汞。为此,我们从污染地区分离出一株具抗汞质粒的假单胞菌*Pseudomonas* sp. B-33。

材 料 与 方 法

1. 菌株 自污染地区分离得假单胞菌 *Pseudomonas* sp. B-33。

本文于1986年10月收到

● 国家教委资助项目。邱国华、翟穗颜参加部分工作

2. 培养基 L-肉汤培养基

3. 具汞盐抗性质粒细菌的筛选 取污染土壤或水样,经含 $100\mu\text{M}$ HgCl_2 的L-肉汤培养液增殖培养48小时后,在抗性平板上进行分离纯化,将所获得的抗汞盐细菌用Doly法^[27]快速抽提质粒,在琼脂糖凝胶电泳上检测质粒带。用质粒消除剂SDS、丝裂霉素C或NTG处理具有质粒的抗汞菌株B-33,得到抗性消失的W-51菌株,进而确定其抗性基因是否存在于质粒上。按Bergey细菌鉴定手册鉴定菌种。

4. 质粒DNA的分离与纯化 参照文献^[28]的方法,将600ml培养液所得的细胞悬浮于15ml、内含溶菌酶5mg/ml的GET(50mM葡萄糖—10mM EDTA—25mM Tris—HCl pH8.0)中,冰浴15分钟后,加30ml SDS裂解液(0.2N NaOH、1%十二烷基硫酸钠),冰浴放置10分钟,再加入3MKAC pH4.8,冰浴10分钟后,12000 rpm离心15分钟。向上清液内加入0.6倍体积的异丙醇,室温放置15分钟,12000rpm离心15分钟后,用70%乙醇洗涤沉淀,离心后干燥,沉淀溶于适量TE中用CsCl-EtBr(溴化乙锭)梯度超离心纯化质粒DNA。用电泳洗脱法^[29]分离纯化所需的质粒DNA。

5. 琼脂糖凝胶电泳 采用0.9%琼脂糖水平平板凝胶电泳,电泳液用0.04M Tris-HCl pH8.0—0.023M NaAc—2mM EDTA。在80—100伏、室温下电泳3—4小时,切下凝胶,在 $0.5\mu\text{g/ml}$ EtBr中染色,然后在254nm紫外光下照相。

6. 转化 按照Dagert和Ehrlich的方法^[30],用电泳分离纯化的质粒DNA对已消除该质粒的W-15菌株作受体菌进行转化。在含 $80\mu\text{g/ml}$ HgCl_2 的L-肉汤平板上可获得转化子。

7. 细菌生长的测定 取少量过夜培养的B-33及消除菌株W-51接种至盛有50ml L-肉汤的250ml锥瓶中,使 $\text{OD}_{550}\approx 0.01$, 37°C 摇床培养,每隔1小时左右取样测OD值。当 OD_{550} 为0.3左右即向各锥瓶内分别加入0.5ml不同浓度的 HgCl_2 溶液,使培养基的 HgCl_2 含量分别为0、20、30及 $40\mu\text{g/ml}$ 。继续培养并定时取样直至OD值趋稳定为止。

8. 汞挥发量的测定 将少量B-33及W-51细胞接种至盛有50ml L-肉汤培养基的250ml锥瓶中, 37°C 摇床培养至 $\text{OD}_{550}\approx 0.8$ 时,加入 HgCl_2 溶液,使培养物含 HgCl_2 浓度为 $15\mu\text{g/ml}$ 。培养70分钟后再加入等量 HgCl_2 ,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 HgCl_2 ,将细胞转入含10ml L-肉汤的250ml锥瓶内,混匀后加入 HgCl_2 使终浓度为 $20\mu\text{g/ml}$ Hg^{2+} ,立即取出1ml作对照并加入1滴10N HNO_3 使汞盐稳定。细胞置 37°C 摇床培养,每隔半小时取样加入 HNO_3 后用原子吸收光谱法测定总汞含量^[31]。

9. 限制酶切割试验及分子量测定 Hind III的酶解缓冲液为10mM Tris-HCl pH8.4、10mM MgCl_2 、60mM NaCl、7mM 2-巯基乙醇。EcoRI的酶解液为6mM Tris-HCl pH7.5、50mM NaCl、6mM MgCl_2 、6mM 2-巯基乙醇。PstI的酶解液为10mM Tris-HCl pH7.5、10mM MgCl_2 、50mM NaCl。约用 $0.5\mu\text{g}$ DNA,一定量酶液, 37°C 反应1小时后加入1/5体积的25%甘油、0.1M EDTA pH8.0、0.05%溴酚蓝以终止反应。用 λcl_{85757} DNA的Hind III酶切片段作为分子量标准,与经酶切割后的质粒DNA在同一琼脂糖凝胶平板上电泳,根据迁移率估算质粒DNA分子量。

10. 电镜观察 参照文献^[32]等方法制片,用日立Hu-12A型电镜观察并照相,用地图仪描述质粒分子的轮廓周长。

结果与讨论

1. 假单胞菌B-33的质粒检测与消除试验

在含 $100\mu\text{M}$ HgCl_2 的L-肉汤中生长良好的假单胞菌B-33,经用Doly法快速抽提质粒进行琼脂糖凝胶电泳,结果见图1-1,发现该菌具有a、b及c三种质粒,其中迁移较迅速的两种质粒在凝胶上还可见到各自的超线团与开环两种构型。

用 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ NTG处理汞盐抗性菌B-33后,获得对 $100\mu\text{M}$ HgCl_2 敏感的菌株W-51。同样采用Doly法检测质粒,在琼脂糖凝胶上仅出现a及c两种质粒,消失了位于中间的b质粒带(图1-4)。初步表明被消除的质粒b与汞盐抗性能力有关,将该质粒暂定名为pBH33。

2. 质粒pBH33的转化试验

用 CsCl-EtBr 梯度超离心纯化的质粒DNA,经电泳法割胶洗脱分离获得的质粒pBH33,以消除菌株W-51作受体进行转化,在含 $80\mu\text{g}/\text{ml}$ HgCl_2 平板上可获得频率为 $1.2 \times 10^3/\mu\text{gDNA}$ 的转化子。任意挑取转化子TB5及TB10按同法抽提质粒DNA进行琼脂糖凝胶电泳,结果如图1-2、3所示,可见转化子均具有质粒pBH33而恢复成含有三种质粒的汞盐抗性菌株。

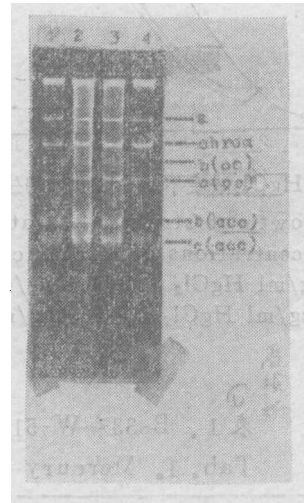


图1 菌株B-33、W-51及转化子质粒DNA的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of plasmids from strains B-33, W-51 and TB5, TB10

1. B-33, 2. TB5, 3. TB10, 4. W-51

3. 不同 HgCl_2 浓度下B-33及W-51菌株的生长测定

在含0、20、30及 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ HgCl_2 的L-肉汤中,两菌株的生长如图2、3所示。由图中可见B-33与W-51在不含汞的L-肉汤中,两者的生长曲线非常相似,而在含汞情况下,W-51菌株细胞生长受强烈抑制,B-33则能在含20及 $30\mu\text{g}/\text{ml}$ HgCl_2 的肉汤中良好地生长,但当浓度增加至 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ HgCl_2 时,其生长亦受抑制。

4. 汞挥发量的测定

诱导后的两个菌株细胞分别移至含 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ Hg^{2+} 的新鲜L-肉汤中,于 37°C 摇床培养,定时取样,测定总汞含量,结果见表1。由表1可知B-33菌株细胞在处理30分钟后,培养物汞离子含量即自 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 下降至 $8.66\mu\text{g}/\text{ml}$ 。据文献^[9,33]报导,许多抗汞细

菌具诱导生成的汞还原酶,能将汞离子还原成金属汞后便以汞蒸气形式迅速从培养基中去除。由此可知,B-33菌株细胞培养物总汞含量的下降是由于该菌细胞内存在着汞还原酶,可使 Hg^{2+} 迅速还原蒸发除去。由表1还可看到,消除菌株W-51在处理60分钟后,其去汞率仅为9.85%,此时,B-33的去汞率为71.4%,是W-51的7倍多。在处理4小时后,W-51的去汞率为20.75%,B-33的去汞率高达90%,为W-51的4.5倍左右。

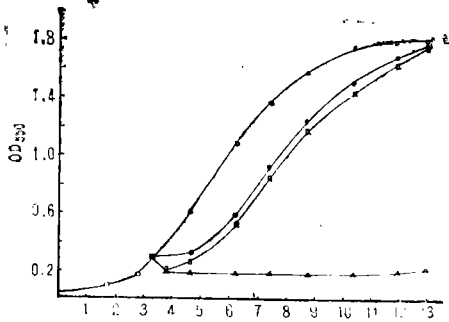


图2 不同 $HgCl_2$ 浓度下B-33菌株的生长
Fig. 2. Growth of strain B-33 at different concentrations of mercuric chloride
(○) $0\mu g/ml HgCl_2$ (●) $20\mu g/ml HgCl_2$
(□) $30\mu g/ml HgCl_2$ (△) $40\mu g/ml HgCl_2$

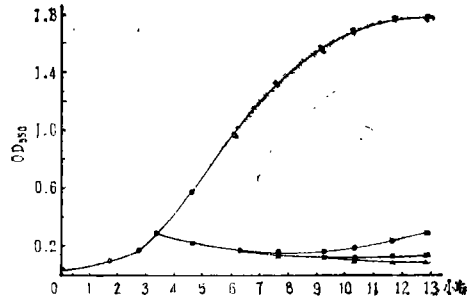


图3 不同 $HgCl_2$ 浓度下W-51菌株的生长
Fig. 3. Growth of strain W-51 at different concentrations of mercuric chloride
(○) $0\mu g/ml HgCl_2$ (●) $20\mu g/ml HgCl_2$
(□) $30\mu g/ml HgCl_2$ (△) $40\mu g/ml HgCl_2$

表1. B-33和W-51菌株的去汞能力

Tab. 1. Mercury removal of strains B-33 and W-51

菌株	处理时间 (分)	处理前 $Hg^{2+}(\mu g/ml)$	处理后 $Hg^{2+}(\mu g/ml)$	去汞率 (%)
B-33	30	20	8.66	66.7
	60		5.72	71.4
	90		4.14	79.3
	120		3.90	80.5
	180		2.48	87.6
	240		2.00	90.0
W-51	60	20	18.03	9.9
	120		16.86	15.7
	240		15.85	20.8

5. 限制酶切割试验及分子量测定

经电泳凝胶分离纯化的质粒pBH33,分别用限制性内切酶EcoRI、PstI及HindⅢ酶解后电泳,结果如图4所示。可见,pBH33经EcoRI酶解后只得到1条单一的带(图4—3),分子量约为 $7.24 \times 10^6 d$ 。用PstI酶解后获得分子量为 4.27 及 $2.95 \times 10^6 d$ 的2

个片段(图4—4), 相加得 7.22×10^6 d, 与EcoRI切割后所得的单一线状分子大小相符。pBH33经HindⅢ酶解后则在凝胶上可见三条电泳带(图4—2), 其分子量分别为2.4、1.9及 1.48×10^6 d, 相加仅得 5.78×10^6 d, 小于前两种限制酶切割的结果, 但从图4—2中可看到, 在三条带中迁移最迅速的小片段显得宽而明显, 推测有2个分子量极相似的小片段重叠, 如再加上该小片段之数, 则分子量为 7.26×10^6 d, 这样便与前两种酶切割后的结果相符, 因此pBH33经HindⅢ酶解后应有4个片段。估算pBH33的分子量约为 7.24×10^6 d。

6. 电镜观察

用电泳法洗脱分离的质粒pBH33 DNA样品, 在电镜下观察到环状DNA分子(图5)。根据经验公式计算得知分子量约为 7.4×10^6 d左右, 与电泳法测定结果相近。

根据上述质粒消除、转化、去汞能力、生长曲线、电泳及电镜等试验结果, 证实假单胞菌B-33菌株具有汞盐抗性质粒, 定名为pBH33质粒。

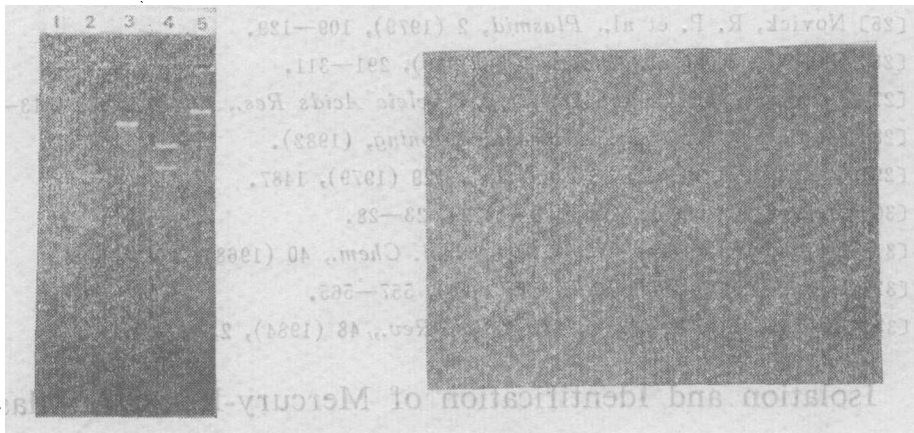


图4 质粒pBH33的酶切电泳图
Fig.4. Restriction digestion pattern of pBH33

1. pBH33	3. pBH33/EcoRI
2. pBH33/HindⅢ	4. pBH33/PstI
5. λ/HindⅢ	

图5 pBH33-DNA的电镜照片(45000×)
Fig.5. Electron micrograph of plasmid pBH33 DNA

参 考 文 献

- [1] Timoney, J. F. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 36 (1978), 3, 465—472.
- [2] Wood, J. M. et al., *Nature*, 220 (1968), 173—174.
- [3] Jensen, S. et al., *Nature*, 223 (1969), 753—754.
- [4] Yamada, M. and K. Touomute, *J. Ferment. Technol.*, 50 (1972), 159—166.
- [5] Komura, T. T. Funaba, and K. Lzaki, *J. Biochem.*, 70 (1971), 895—901.
- [6] Summers, A. O. and S. Silver, *J. Bacteriol.*, 112 (1972), 3, 1228—1236.
- [7] Summers, A. O. and L. I. Sugarman, *J. Bacteriol.*, 119 (1974), 242—249.
- [8] Furukawa, K. and K. Tonomura, *Agric. Biol. Chem.*, 36 (1972), 217—226.
- [9] Clark, D. L. et al., *J. Bacteriol.*, 132 (1977), 186—196.

- [10] Olson, B. H. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **38** (1979), 478—485.
- [11] Summers, A. O. and E. Lewis, *J. Bacteriol.*, **113** (1973), 1070—1072.
- [12] Weiss, A. A. et al., *J. Bacteriol.*, **152** (1977), 197—208.
- [13] Olsen, G. J. et al., *J. Bacteriol.*, **151** (1982), 1230—1236.
- [14] Meissner, P. S. et al., *J. Bacteriol.*, **157** (1984), 669—672.
- [15] Furukawa, K. and K. Tonomura, *Agric. Biol. Chem.*, **35** (1971), 604—610.
- [16] Nelson, J. D. et al., *Appl. Microbiol.*, **26** (1973), 321—326.
- [17] Weiss, A. A. et al., *J. Bacteriol.*, **132** (1977), 197—208.
- [18] Schottel, J. L., *J. Biol. Chem.*, **253** (1978), 4341—4349.
- [19] Stanisich, V. A., *Mol. Gen. Genet.*, **128** (1974), 210—212.
- [20] Kondo, I. et al., *J. Bacteriol.*, **117** (1974), 1, 1—7.
- [21] Smith, D. H., *Science*, **156** (1967), 1114—1116.
- [22] Foster, T. J., *Microbiol. Rev.*, **47** (1983), 361—409.
- [23] Novick, R. P. et al., *J. Bacteriol.*, **90** (1965), 467—480.
- [24] Summers, A. O. and S. Silver, *Rev. Microbiol.*, **32** (1978), 637—672.
- [25] Novick, R. P. et al., *Plasmid*, **2** (1979), 109—129.
- [26] Shulita, Z. et al., *Plasmid*, **3** (1980), 291—311.
- [27] Birnboim, H. C. and Doly, J., *Nucleic Acids Res.*, **7** (1979), 6, 1513—1522.
- [28] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning*, (1982).
- [29] Tanaka, T. et al., *J. Bacteriol.*, **129** (1979), 1487.
- [30] Dagert, M. et al., *Gene*, **6** (1979), 23—28.
- [31] Hatch, W. R. and W. L. Ott, *Anal. Chem.*, **40** (1968), 2085—2087.
- [32] Lang, D., *J. Mol. Biol.*, **54** (1970), 557—565.
- [33] Robinson, J. B. et al., *Microbiol. Rev.*, **48** (1984), 2, 95—124.

Isolation and Identification of Mercury-Resistant Plasmid pBH33 in *Pseudomonas*

Zhou Zhenlin Luo Jinxian Li Zhenlin Hu Jinxin

Abstract

Pseudomonas sp. B-33 isolated from the contaminated environment is capable of growth in the presence of 100 μ M HgCl₂. Three kinds of plasmids were detected in agarose gel electrophoresis. The mercuric reducing activity was measured and verified in the strain by atomic absorption spectroscopy. A cured derivative of B-33 was obtained by NTG treatment. This strain lacks one of the 3 plasmids in B-33 and fails to grow in the presence of 100 μ M HgCl₂. The mercuric reducing ability was markedly decreased in the cured strain. The cured plasmid (designated pBH33) was isolated and purified by electrophoresis and open circular DNA molecules were observed under electron microscope. There are one site for EcoRI, two sites for PstI and four sites for HindIII. The molecular weight of pBH33 was estimated to be about 7.24 $\times 10^6$ d. by agarose electrophoresis. The cured strain was transformed by pBH33 and mercuric resistant ability was recovered.

Keywords Mercury resistant plasmid, *Pseudomonas*, Restriction endonucleases.