

# 真养雷氏菌 DKC1 菌株镉抗性 *czcC* 基因的克隆与表达

段学军<sup>1,2</sup> 闵 航<sup>1\*</sup> 吕文平<sup>1</sup> 夏 颖<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>浙江大学生命科学院 杭州 310029)

(<sup>2</sup>中原工学院 郑州 450009)

**摘 要** 利用 PCR 技术从真养雷氏菌(*Ralstonia eutropha*)菌株质粒中扩增出 1.2kb 的镉抗性系统结构修饰蛋白的编码基因 *czcC* 然后将其克隆到 pGEM-T-easy 载体上,构建重组质粒,经 *EcoR* I 酶切分析和核苷酸序列分析,与 GenBank 中登录的 *czcC* 基因序列相似性高达 98% 显示其具有正确的 *czcC* 基因核苷酸序列,并利用 pET-30a(+) Vector 在 *E. coli* BL21 中进行了成功表达。为进一步研究微生物抗镉机理及构建耐镉基因工程菌提供重要的基础资料。

**关键词** 真养雷氏菌, *czcC*, 克隆与表达

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2004)04-0461-04

自从 Anne Summers 发现抗汞细菌能够使  $\text{Hg}^0$  以单原子的形式将汞挥发掉以后<sup>[1]</sup>,关于细菌质粒对毒性无机阳离子和阴离子的抗性研究即已开始。研究表明,许多细菌具有对毒性重金属离子的抗性质粒编码系统,基于对其抗性的分子基因及环境行为的了解,近年的研究已取得很大进展,抗性基因工程菌的构建也已萌芽<sup>[2]</sup>。目前国外研究已经揭示,  $\text{G}^-$  细菌镉抗性决定子是一个编码 4 个蛋白的 *czcCBAD* 操纵子,符合多蛋白化学渗透假说。但对于该基因的功能,研究者们尚无一致看法,以镉为目的物的抗性基因工程菌的研究也尚未开始<sup>[3-5]</sup>。本实验室从长期受 Cd 处理的土壤中分离到一细菌——真养雷氏菌(*Ralstonia eutropha*) DKC1 菌株,对镉具有很强的抗性,可在含镉 350mg/L 的培养基上生长,大大高于普通菌株对镉的耐受性,研究发现这一菌株的重金属抗性机制与  $\text{G}^-$  细菌的重金属抗性机制相同<sup>[6]</sup>。抗性基因及其表达产物的获得将大大推动微生物对重金属抗性机理的研究。

本文报道对一株抗镉菌株 *Ralstonia eutropha* 的镉抗性系统中结构修饰蛋白的编码基因 *czcC* 的克隆,得到了与镉底物专一性有关的 *czcC* 基因,并使其在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 中得到表达。这在国内尚未见相关报道,结果可为进一步阐明细菌抗镉机理,进而构建耐镉基因工程菌,高效净化环境重金属污染提供重要理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品来源** 供试菌株为从长期镉处理浙江华家池黄松田稻田土中筛选分离到的一株可在含 350mg/L  $\text{CdCl}_2$  的培养基上生长的抗镉菌株,菌株命名为 DKC1。该菌经 16S rDNA 同源性分析、BIOLONG-NGN 以及 (G + C)mol% 分析鉴定为 *Ralstonia eutropha*。

**1.1.2 试剂** pGEM-T Easy Vector system I 试剂盒购自 Promega 公司, pET-30a(+) Vector、*E. coli* BL21 菌株购自 Invitrogen 公司, T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Xho* I、*Kpn* I 购自上海生工生物技术有限公司;一抗自制,二抗碱磷酶标记鼠抗兔 IgG 购自 Vector 公司,其它常规试剂均为国产或进口分析纯。

### 1.2 质粒提取和检测

质粒 DNA 的分离和纯化采用碱裂解法<sup>[7]</sup>。质粒的消除:取 1mL 活化过夜的菌液移入到 4mL 新鲜 LB 培养基中,用下列 3 种方法处理 (1) 43℃ 20h; (2) 培养基中含 20mg/L SDS 30℃ 24h (3) 培养基中含 20 mg/L SDS 43℃ 24h。将处理后的培养液稀释并涂 LB 平板, 30℃ 培养过夜。将其生长的菌落影印到含 200mg/L  $\text{Cd}^{2+}$  的 LB 平板上, 30℃ 培养 24h 观察结果。并对两种平板上单菌落进行质粒检测<sup>[8]</sup>。用电泳纯化的质粒 DNA 以感受态 *E. coli* 作受体菌

基金项目 国家科技部社会公益研究专项资金项目(177-2-3)

\* 通信作者。Tel 86-571-86971287 Fax 86-571-86971634 E-mail minhang@zju.edu.cn

作者简介 段学军(1969-)男,山西祁县人,讲师,在读博士生,主要从事土壤与环境微生物学的研究。E-mail dxjsqy@163.com

收稿日期 2003-11-24,修回日期 2004-03-08

进行转化;取转化液涂于含 200mg/mL  $\text{Cd}^{2+}$  的 LB 平板上 30℃ 培养 24h 观察结果 纯化质粒 DNA。

### 1.3 以质粒为模板的 PCR 扩增

**1.3.1 引物的设计及合成** 参考 GenBank 上已登录的来源于的 *czcC* 基因序列 (Accession 分别为 M26073、X67305、X984519), 下载后输入“Oltgo DNA/RNA Primer Analysis Software”程序中进行引物设计。经计算机处理及筛选, 确定: 上游引物为 5'-GTCTCGAGAGTGTGCCCCGTCTTCCCAA-3' (含 *Xho* I 酶切位点); 下游引物为 5'-GATACCATCGATCG Y(C/T) TTCTGGGACGT-3' (含 *Kpn* I 酶切位点)。

引物由上海 Sangon 合成。合成的引物经 PAGE 纯化后使用。

**1.3.2 PCR 扩增** PCR 扩增参照文献 [9, 10] 并加以改进。扩增反应体积 50  $\mu\text{L}$  [11]: 10  $\times$  PCR 缓冲液 5  $\mu\text{L}$ ,  $\text{MgCl}_2$  (25mmol/L) 4  $\mu\text{L}$ , dNTP 3  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 1  $\mu\text{L}$ , *Taq* 酶 (10000U/mL) 0.5  $\mu\text{L}$ , 重蒸水 34.5  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 95℃ 2min; 94℃ 1min, 60℃ 1min, 72℃ 1min, 35 个循环, PCR 反应在 PTC-200 型热循环仪上进行。反应结束后取 5  $\mu\text{L}$  反应液 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.3.3 PCR 产物回收** 将 PCR 产物溶于 400  $\mu\text{L}$  无菌水中, 加入等体积的酚到离心管中, 迅速颠倒混匀, 12000r/min 离心 10min; 取上清液, 加入 1:1 的酚: 氯仿 (V/V), 12000r/min 离心 10min; 上清液中加入 1:1 (V/V) 的氯仿: 异戊醇 (24:1), 12000r/min 离心 10min; 取上清液, 加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc (pH 5.2) 和 2 倍体积的 95% 乙醇混匀, 于 -20℃ 沉淀过夜; 12000r/min 离心 10min, 沉淀加入 500  $\mu\text{L}$  70% 乙醇洗一次, 沉淀于室温干燥 20min, 溶于 20  $\mu\text{L}$  水中, -20℃ 保存。

### 1.4 DNA 限制性酶切、连接和转化

回收的 PCR 产物及 pGEM-T Easy 分别用 *Xho* I 和 *Kpn* I 酶切。T4 DNA 连接酶 4℃ 连接 24h, 连接产物转化感受态细胞, 具体操作详见文献 [7]。通过质粒 DNA 的提取以鉴定重组子。

### 1.5 核酸序列的测定和分析

核酸序列的测定采用 Sanger 双脱氧链中止法, 使用 Megabase 1000 sequencer 测序仪。核酸序列的翻译采用 DNASTar 软件包中的 Editseq 软件进行, 氨基酸序列同源性分析采用 Clustal W (1.8) 进行。

### 1.6 *czcC* 基因的表达

对得到的阳性克隆子进行质粒抽提, 用 *Kpn* I 和 *Xho* I 对所得重组质粒及表达载体 pET-30a(+) 和

Vector 进行双酶切, 电泳检测。经连接、转化后在含卡那霉素 (Kan) 的 LB 平板上利用卡那霉素抗性进行筛选挑斑, 利用 PCR 扩增及双酶切双重鉴定。

分别取表达产物和等量的阴性对照进行 12% SDS-PAGE 检测, 经电转法将其移到 NC 膜上, 进行 Western blot 鉴定 [8], 蛋白质 Marker 经丽春红染色。

## 2 结果和讨论

### 2.1 DKC1 菌株的质粒检测

为对该菌株进行抗镉基因的初步定位, 进行了该菌株质粒 DNA 的分离和纯化、质粒的消除及转化研究。结果表明, 该菌株含有质粒, 使用 3 种不同方法处理菌株后对其进行质粒检测, 发现单纯高温处理不能使抗性消失, 但培养基中含 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  SDS 30℃ 24h 或含 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  SDS 43℃ 24h 处理均可以使抗性消失。对抗性消失的菌株进行质粒检测结果表明, 质粒已被消除。转化结果显示, 经转化的 *E. coli* 菌株表现出对 Cd 的抗性, 可以在含 200mg/L  $\text{Cd}^{2+}$  的 LB 平板上生长, 由此可见抗性基因定位于质粒上 [12]。

### 2.2 目的基因的 PCR 扩增结果

以 *Ralstonia eutropha* DKC1 菌株的质粒 DNA 为模板, 扩增得到一大小约为 1200bp 的特异性条带, 与设计引物之间的区域大小基本一致, 达到引物设计的预期目的。

### 2.3 基因克隆

菌株总 DNA 经限制性酶切后与质粒连接, 转化 *E. coli* BL21, 经 2,3-二羟基联-乙醚喷雾后, 挑取白斑作为转化子。提取转化子质粒 DNA, 用 *Xho* I 和 *Kpn* I 进行双酶切检测克隆片段, 琼脂糖电泳得到 3kb 和 1.2kb 左右的两条片段 (图 1), 分别对应于克隆载体和目的基因。

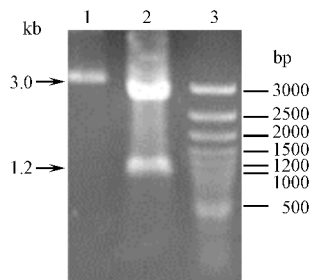


图 1 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 1 Digestion of recombinant plasmid by *Xho* I and *Kpn* I

1. Recombinant plasmid; 2. Recombinant plasmid by *Xho* I and *Kpn* I; 3. Marker.

### 2.4 序列测定

测序结果在 GenBank 中登录号为 AY563039, 分

析结果表明,该基因的完整序列全长 1183bp,(G+C)mol%含量为 61.3%,编码 387 个氨基酸残基。将该基因序列与 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 网站数据库中已收录的相关菌株 *czcC* 基因序列进行比对分析发现,不同菌株间 *czcC* 基因差异较小,与 *Ralstonia* sp. CH34 *czcN* 和 *Alcaligenes* sp. 的同源性分别高达 99% 与 *Ralstonia metallidurans* Reut\_310 也具有 80% 的同源性,是一较为保守的序列<sup>[13-15]</sup>。

2.5 重组菌株的全细胞蛋白电泳检测和蛋白质印迹鉴定

分别将含有重组质粒(连有目的基因)及不携带质粒的表达宿主菌株 *E. coli* BL21 过夜培养并经 IPTG 诱导后,进行全细胞蛋白电泳的检测。结果发现,与含有空质粒的表达宿主菌相比,连接有目的基因的重组菌株的全细胞蛋白电泳图谱中,在 36kD 附近有一非常明显的特异性蛋白条带(图 2-A)。蛋白质印迹(图 2-B)显示表达样品同样在 36kD 的相应位置,其分子量大小与理论预测值 36.52kD 相符,表明 *czcC* 基因已在 *E. coli* 中得到成功表达。

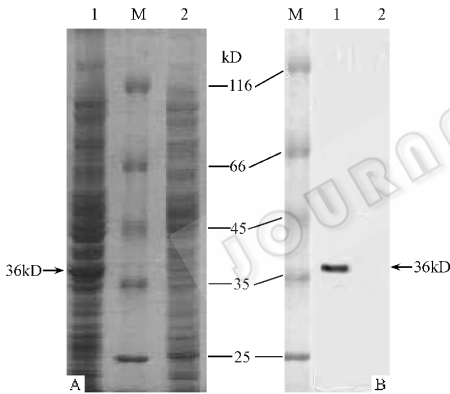


图 2 *czcC* 蛋白在 *E. coli* BL21 中表达产物的 SDS-PAGE 检测及蛋白质印迹鉴定

Fig.2 SDS-PAGE(A) and Western blot(B) analysis of *czcC* protein expressed in *E. coli* BL21  
M. Molecular mass marker; 1. Total protein sample expressed in *E. coli* BL21 2. Negative control without *czcC* gene inserted.

3 结论

镉是环境中一种广泛存在的重要重金属污染物,镉与多数重金属和放射性元素一样,需要从污染的环境中加以去除才能使污染环境得以修复。利用生物工程的手段进行改造和培养,赋予生物特别是重金属以超积累能力,具有很好的研究与应用前景<sup>[16]</sup>。*Ralstonia eutropha* 菌镉抗性系统结构修饰蛋

白的编码基因 *czcC* 的克隆,并使其在大肠菌中表达,将有助于对菌株抗性机制的进一步研究以及抗性基因的精确定位,并对了解细菌的重金属抗性遗传机制,进而构建重金属抗性基因工程菌,进行重金属污染的生物治理具有重要意义。

参 考 文 献

[1] Silver S. Bacterial resistance to toxic metals. *Microbiol Rev*, 1992, **56**(1):195-228.  
[2] Silver S. Bacterial resistance to toxic metals determined by extrachromosomal R factors. *Ann Rev Microbiol*, 1994, **29**:36-42.  
[3] Dietrich H N. CzcR and CzcD gene products affecting regulation of resistance to Cobit, Zinc, and Cadmium in *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology*, 1992, **174**(24):8102-8110.  
[4] Dietrich H N, Anke N, Simon S, et al. Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. *Proc Natl Acad Sci*, 1989, **86**:7351-7355.  
[5] Diels L, Dong Q, van der Lelie D, et al. The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34: from resistance mechanism to the removal of heavy metals. *J Ind Microbiol*, 1995, **14**(2):142-153.  
[6] 段学军, 闵航. 一株抗镉细菌的分离鉴定及其抗性基因定位的初步研究. 2004, **24**(1):154-158.  
[7] van der Lelie D, Schwuchow T, Schwidetzky U, et al. Two-component regulatory system involved in transcriptional control of heavy-metal homeostasis in *Alcaligenes eutrophus*. *Journal Mol Microbiol*, 1997, **3**(3):493-503.  
[8] Osborn F, Blinder R, Justin R E, et al. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林译. 北京: 科学出版社, 2001.  
[9] Ogawa N, Miyashita K. The chlorocatechol-catabolic transposon Tn5707 of *Alcaligenes eutrophus* H9, carrying a gene cluster highly homologous to that in the 1,2,4-trichlorobenzene-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. strain P51, confers the ability to grow on 3-chlorobenzoate. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(2):724-731.  
[10] Damiani G, Amedeo P, Bandi C, et al. Bacteria Identification by PCR-Based Techniques. Chapter 10, *Microbial Genome Methods*. London: CRC Press, 1996:167-173.  
[11] Devereux R, Willis S G. Amplification of ribosomal RNA sequences. *Molecular Microbial Ecology Manual*. Netherland: Kluwer Academic Publishers, 1995:11-17.  
[12] 张素琴, 赵姬勇, 马国华, 等. 污染环境中细菌质粒的研究. *生态学报*, 1990, **10**(4):338-342.  
[13] Juhnke S, Peitzsch N, Hubener N, et al. New genes involved in chromate resistance in *Ralstonia metallidurans* strain CH34. *Journal Arch Microbiol*, 2002, **179**(1):15-25.  
[14] Borremans B, Hobman J L, Provoost A, et al. Cloning and functional analysis of the *pbr* lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. *J Bacteriol*, 2001, **183**(19):5651-5658.  
[15] Clement P, Pieper D H, Gonzale B. Molecular characterization of a deletion/duplication rearrangement in *tfd* genes from *Ralstonia eutropha* MP134(pJP4) that improves growth on 3-chlorobenzoic acid but

abolishes growth on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Microbiology*, 2001, **147**(8): 2141–2148.

[16] 王 黎, 郑龙熙. 生物治理的新工具-重金属耐受基因. 国外金属矿选矿, 1999, **5**: 18–23.

## Cloning and Expression of The Cadmium Resistant Determinant *czcC* in *Escherichia coli*

DUAN Xue-Jun<sup>1,2</sup> MIN Hang<sup>1\*</sup> LU Wen-Ping<sup>1</sup> XIA Ying<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

(<sup>2</sup> Zhongyuan Institute of Technology, Zhengzhou 450009, China)

**Abstract**: The full-length *czcC* gene encoding the structure modified protein in cadmium resistance system of *Ralstonia eutropha* was amplified by PCR and cloned into prokaryotic pGEM-T-easy, the recombinant plasmid was constructed. The sequencing results showed that there was the comparability about 98% between the sequence from the strain and the same gene accessed on the GenBank database. Then, it was successfully expressed in the *E. coli* BL21. The work will be available in further studies on cadmium resistance of microorganism and the design of gene-engineering bacteria which are able to live in environments contaminated with higher concentration of cadmium.

**Key words**: *Ralstonia eutropha*, *czcC*, Cloning and Expression

Foundation item: The Foundation of The Chinese Ministry of Science and Technology(177-2-3)

\* Corresponding author. Tel: 86-571-86971287, Fax: 86-571-86971634, E-mail: minhang@zju.edu.cn

Received date: 11-24-2003

## The Eighth Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica

### EDITOR-IN-CHIEF

LI Ji-Lun Academician

(College of Biology, Chinese Agricultural University, Beijing 100094, China)

### VICE-EDITOR-IN-CHIEF

TAN Hua-Rong Professor

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

LU De-Ru Professor

(Institute of Genetics, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

WANG Ao-Quan Professor

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

QU Yin-Bo Professor

(School of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China)

XU Jian-Guo Professor

(National Institute of Communicable Diseases Prevention and Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

### MEMBERS OF THE BOARD

CAI Yong-Feng

CHEN Yong-Qing

CHENG Chi

DONG Xiu-Zhu

FAN Yun-Liu

GUO Jun

HU Fu-Quan

HU Yuan-Yang

HUANG Li

LU Cheng-Ping

MIN Hang

QIAN Shi-Jun

SHAO Yi-Ming

SHENG Jun

TANG Hong

TIEN Po

WANG Ping

WANG Hua-Ming(USA)

XIE Hong

YANG Su-Sheng

ZHAI Zhong-He

ZHANG Yao-Ping(USA)

ZHENG Tian-Ling

ZHU Bao-Quan

ZHUGE Jian

### MANAGING EDITORS

WANG Jin-Fang

WANG Min