

## 抗性库蚊酯酶基因在大肠杆菌中的克隆和表达\*

闫艳春<sup>1,2</sup> 乔传令<sup>2</sup> 尚宏宇<sup>3</sup> 钱传范<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>山东农业大学生命科学院 泰安 271018)(<sup>2</sup>中国科学院动物研究所 北京 100080)

(<sup>3</sup>Madison WI53703 USA)(<sup>4</sup>中国农业大学应用化学系 北京 100094)

**提 要:**用抗性库蚊酯酶基因,引入原核表达载体 pRL439,转化大肠杆菌 HB101 细胞,获得表达。通过酶切、Southern 杂交鉴定重组质粒。研究了重组菌酯酶的活性,重组质粒 pRLB1 表达的酯酶具有高酶活并能高效降解酯酶的特异性底物  $\alpha$ -乙酸萘酯( $\alpha$ -NA)和  $\beta$ -乙酸萘酯( $\beta$ -NA);经对重组菌进行细胞固定化后降解农药三氯杀虫酯(7504),反应时间短,降解效率高。

**关键词:**酯酶基因, 基因表达, 大肠杆菌, 降解农药

**中图分类号:**Q768 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2000)02-0126-31

抗性尖音库蚊五带亚种(*Culex pipiens quinquefasciatus*)的酯酶基因至少扩增 250 倍,抗性倍数达 500 倍<sup>[1]</sup>。利用该酯酶基因的表达产物可将农药降解而使其失去毒杀作用,将该基因克隆到质粒 pRL-439 中,再将重组质粒转入大肠杆菌,高效表达该酯酶基因。所得工程菌经细胞固定化后制成生物反应器用于被农药污染水体的净化,将是一种被看好的生物治理发展方向。由于固定化微生物处理废水技术的显著优点而日益受到国内外专家和学者的重视<sup>[2~4]</sup>,利用转基因微生物降解有机污染物更是一研究热点<sup>[5~6]</sup>。

本文报道了将抗性库蚊的酯酶基因克隆、在大肠杆菌中的表达以及表达产物酶活的提高。将该工程菌固定化后对有机氯农药 7504 进行降解,结果表明固定化的工程菌能高效降解此类农药。国内外尚未见到有关该酯酶基因表达产物的研究报道。随着环境治理水平的不断提高,该研究旨在研究生物反应器用于净化被有机磷、有机氯和拟除虫菊酯等农药污染了的水,为达到快速、安全、经济地治理环境提供科学依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 细菌与质粒:**大肠杆菌 HB101,转化受体菌。大肠杆菌质粒 pRL-439 上有启动子  $P_{psbA}$ ,这是一个在叶绿体、大肠杆菌和蓝藻中都很强的启动子,本研究中用于启动 B1 的表达;此外还包含氨苄青霉素抗性基因  $Amp^r$ , $P_{psbA}$ 下游有一个 *EcoRI* 和一个 *BamHI* 位点,*EcoRI* 位点用于克隆 B1-cDNA,*BamHI* 用于连接时鉴定正向克隆,该质粒由中国科学

\* 国家自然科学基金资助项目(39680001);山东省自然科学基金资助课题(Y98D16064)

作者简介:闫艳春(1959-),女,安徽省宿县人,山东农业大学生命科学院微生物系副教授,博士,主要从事环境污染的生物整治和分子生物学方面的教学和研究

收稿日期:1998-11-26,修回日期:1999-06-01

院植物研究所施定基教授提供。大肠杆菌质粒 pUC19-B1 是目的基因,在该 1.33kb 的 B1-cDNA 距 3'端不到 300bp 处有一 *Bam*HI 位点,抗性标记为  $Amp^r$ ,由法国蒙贝利埃大学 Michel Raymond 教授提供。

**1.1.2 培养基:**LB 培养基按文献[7]配制。

**1.1.3 抗生素:**氨苄青霉素。

**1.1.4 主要酶制剂:**所用工具酶包括各种限制性内切酶、RNase、溶菌酶、DNA 聚合酶 I 大片段、T4DNA 连接酶、牛小肠碱性磷酸酶等购自美国 Promega 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 DNA 的操作:**质粒提取、限制酶酶切反应、琼脂糖凝胶电泳、DNA 片段的分离与回收、DNA 连接、转化以及 Southern 杂交等均按文献[7~8]方法进行。

**1.2.2 大肠杆菌感受态细胞的制备和转化:**按文献[7~8]方法进行。

**1.2.3 DNA 探针的制备及纯化:**按文献[7~8]方法进行。

**1.2.4 重组菌的酯酶酶活分析<sup>[9]</sup>:**酯酶与其特异性底物  $\alpha$ -乙酸萘酯( $\alpha$ -NA)和  $\beta$ -乙酸萘酯( $\beta$ -NA)作用后,反应产物的生成量与 OD 值成正比,据此测定重组菌酯酶酶活。取不同细菌体积的不同世代进行

表 1 重组菌酯酶酶活分析体系组成

Table 1 Enzyme analysis system of recombinant bacteria

No. of tube	Phosphate buffer/mL	$\alpha$ -NA( $\beta$ -NA) * / $\mu$ L	<i>E. coli</i> /mL	Culture time /h
1	1.5	50	1.0	1.5
2	1.3	50	1.2	1.5
3	1.1	50	1.4	1.5
4	0.9	50	1.6	1.5
5	0.7	50	1.8	1.5
6	0.5	50	2.0	1.5

\* Con.0.01117g/mL.

测定。(1)挑取转基因的大肠杆菌单菌落,转入 20mL LB 液体培养基中(含氨苄青霉素 100 $\mu$ g/mL),于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。(2)按下表组成反应系统:(3)向各试管加入 0.5mL DBLS,静置 15min。(4)测定 OD<sub>600</sub> ( $\beta$ -NA 为 OD<sub>555</sub>)吸收值。

各溶液的配制:磷酸缓冲液(pH7.0):57.7g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,42.3g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,溶于 100mL 水中,加入 1%的 TritonX-100。DBLS 溶液:1%固兰 B 加 5%SDS(1%固兰 B:5%SDS=2:5),现配现用。试剂空白:用乙醇代替试样。

**1.2.5 工程菌的固定化<sup>[10]</sup>:**(1)挑取转基因的大肠杆菌菌落,转入 250mL LB 液体培养基中(含氨苄青霉素 100 $\mu$ g/mL),于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜;(2)5000r/min 离心 7min,收集细胞;(3)用 ddH<sub>2</sub>O 洗涤细胞二次;(4)取 1g 湿重细胞,加入到 9g3%的海藻酸钠(pH7.0)中,充分混匀;(5)用内径 3mm 的滴管向 3%的 CaCl<sub>2</sub>(pH7.0)溶液中滴加上述混合菌液,滴加时应不断搅拌;(6)成球后静置 1h;(7)取出固定球,用 ddH<sub>2</sub>O 洗涤三次,以除去多余离子。

**1.2.6 固定化大肠杆菌与农药三氯杀虫酯(7504)的作用及气相色谱(GC)检测<sup>[11]</sup>:**(1)将转基因大肠杆菌按步骤 1.2.5 固定;(2)将固定化的细胞小球转入 100mL 三角瓶中;(3)加入 20mL H<sub>2</sub>O,1mL 2% TritonX-100,5 $\mu$ L 7504(2.72mg/mL),充分混匀后置于 30 $^{\circ}$ C 摇床摇动,使其充分反应;(4)每隔 1h 取出 1mL 处理液置于 5mL 试管中;(5)1mL 样品中加入 1ml 重蒸正己烷,在混旋器上振荡 3 min 充分混匀;(6)6500 r/min 离心 15 min,取上清液留作检测用;(7)取出上清液后的剩余部分中再加入 1mL 重蒸正己烷,在混旋器

上振荡 3 min 充分混匀;(8)6 500r/min 离心 15 min,取上清液并与上次取出的上清液合并后作为检测样品;(9)气相色谱检测。

气相色谱(GC)条件:电子捕获检测器,25m HP-1 毛细柱,内径 0.32mm,检测器温度 320℃,进样口温度 290℃,柱温 250℃,载气为高纯 N<sub>2</sub>,流速为 1mL/min。

## 2 结果和讨论

### 2.1 pRLB1 的构建

将 pUC19-B1、pRL-439 质粒分别用 *EcoRI* 消化,连接、转化大肠杆菌,获克隆化质粒 4.0kb 的 pRL-B1(图 1)。18 个重组子中随机取 5 个阳性克隆(编号为 1~5)进行电泳以检验目的片段是否插入(图 2),其中两个片段大于 5.148kb(C 道和 D 道),由 B1-cDNA (1.33kb)及 pRL-439 (2.70kb)的长度可判断大于 5.148kb 的重组子中有双拷贝 B1-cDNA 基因插入。三个(E、G、H 道)约为 4.0kb,这三个重组子中有单拷贝 B1-cDNA 基因插

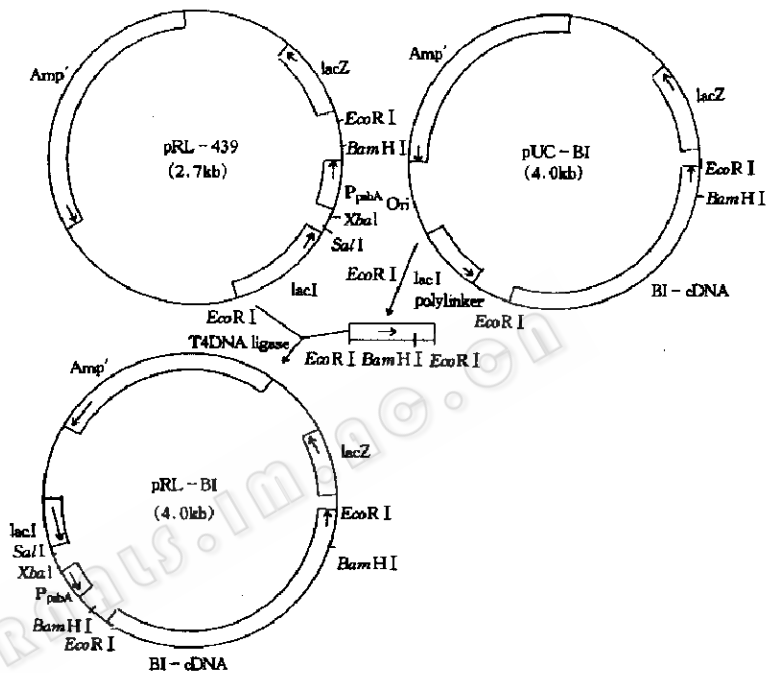


图 1 重组质粒 pRL-B1 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pRL-B1

入。取这三个含单拷贝 B1-cDNA 基因的重组子(1、2、3 号)用 *BamHI* 酶切,同时以 pUC19-B1(A 道)的 *EcoRI* 酶切质粒,3 号(E 道)的 *XbaI* 酶切片段作为对照(图 3)。其中 1、2 号(C、D 道)切得一条片段,为反向克隆。3 号(B 道)切得两条可见片段。根据质粒图谱可知,若为正向克隆,*BamHI* 应切出两段,一段与 pRL-439 分子量相近(稍大于 2.7kb),另一段分子量略小于 B1-cDNA(小于 1.33kb),3 号重组子所切片段大小与理论推测一致,为正向重组子,以下使用正向重组子 pRL-B1。

### 2.2 重组质粒 pRLB1 的 Southern 杂交

用 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP 标记 pUC19-B1 的 *EcoRI* 酶切回收片段,以此为探针,对重组质粒 pRLB1 进行 Southern 杂交(图 4)。pRL-439 为阴性;未酶切的 pRLB1(pRLB1 道)有杂交条带出现,初步判断目的片段已插入载体质粒;酶切后的重组子中插入片段大小正确与否通过用 *EcoRI* 对 B1 和 pRLB1 酶切(B1/E1,pRLB1/E1)鉴定,pRLB1 所切得的片段大小与 B1 相同,证明目的片段 B1 cDNA 已插入载体 pRL-439 的多克隆位点。

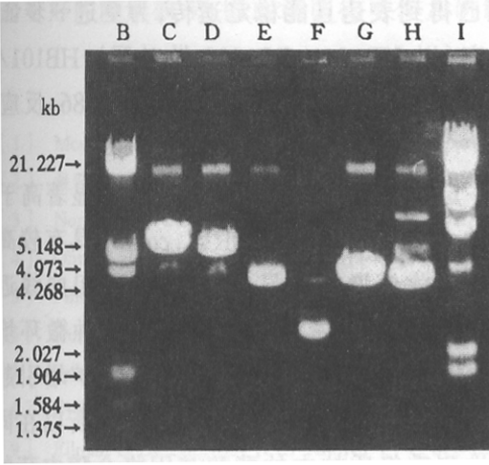


图2 五个阳性克隆 *Xba*I 酶切后 0.8% 琼脂糖凝胶电泳  
 Fig.2 0.8% agarose gel electrophoresis of five recombinant plasmid DNAs digested by *Xba*I  
 B.  $\lambda$ DNA/*hind*III + *Eco*RI; C. No. 5/*Xba*I;  
 D. No. 4/*Xba*I; E. No. 3/*Xba*I;  
 F. pRL-439/*Rco*RI; G. No. 2/*Xba*I;  
 H. No. 1/*Xba*I; I.  $\lambda$ DNA/*Hind*III.

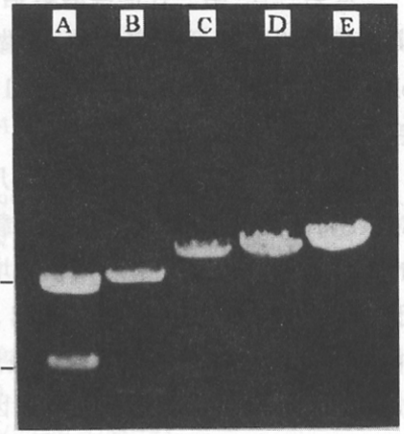


图3 三个重组子 *Bam*HI 酶切后 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定正向克隆  
 Fig.3 Restriction patterns of three recombinant plasmids DNAs digested by *Bam*HI, *Eco*RI and *Xba*I  
 A. pUC-B1/*Eco*RI; B. No. 3/*Bam*HI; C. No. 2/*Bam*HI; D. No. 1/*Bam*HI; E. No. 3/*Xba*I.

2.3 工程菌的酯酶活性测定

为了检测酯酶基因 B1 的表达,以酯酶的特异性底物  $\alpha$ -NA 和  $\beta$ -NA 为底物测定酶的活性。第一代工程菌 HB101/pRL-B1 共重复 4 次(以 HB101/pRL-439 做对照),反应趋势一致,HB101/pRL-B1 的菌液初始  $OD_{600} = 0.6532$ ,HB101/pRL-439 的菌液初始  $OD_{600} = 1.2000$ , (图略)。第二代工程菌 HB101/pRL-B1 从第一代实验知 B1 基因得到表达,表达性状是否能稳定遗传,需做工程菌 HB101/pRL-B1 对  $\alpha$ -NA 降解的继代研究。取第二代工程菌菌液进行研究,同时以 HB101/pRL-439 做对照。重复 4 次,反应趋势一致,HB101/pRL-B1 的菌液初始  $OD_{600} = 0.7835$ ,HB101/pRL-439 的菌液初始  $OD_{600} = 1.4920$ ,实验结果见图 5。

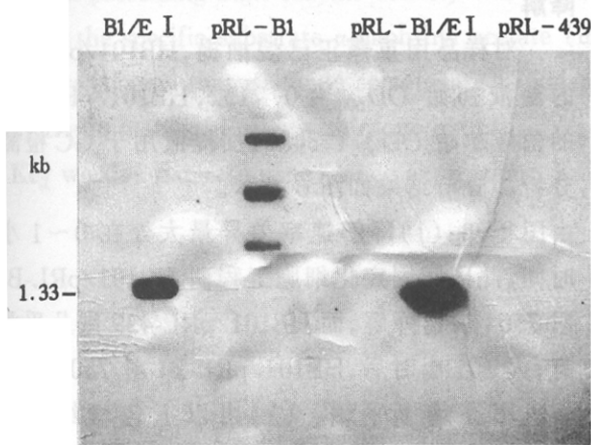


图4 重组质粒 pRL-B1 的 Southern 杂交分析  
 Fig.4 Southern hybridization of recombinant plasmid pRL-B1

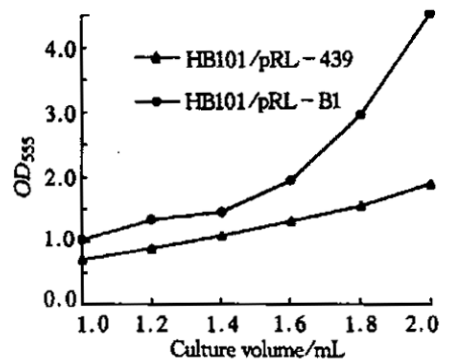


图5 HB101/pRL-B1 脱毒功能分析  
 Fig.5 Enzyme activity analysis of detoxification of HB101/pRL-B1

从第一代、第二代的实验数据得知, B1 基因已得到表达且能稳定遗传, 为进一步证实该菌株的表达可稳定遗传, 又做了第三代研究(以 HB101/pRL-439 做对照), HB101/pRL-B1 的菌液初始  $OD_{600} = 0.7152$ , HB101/pRL-439 的菌液初始  $OD_{600} = 1.3486$ , 反应趋势基本同于第二代。

由上述三代实验可得到以下几点结论:(1)一定波长下, pRL-B1 组的吸收值显著高于对照组, 说明 B1-cDNA 不仅插入载体 pRL-439 的多克隆位点, 而且在 *E. coli* 中具有较高的表达效率;(2)随着菌液体积的增加, pRL-B1 的吸收值增加明显, 而 pRL-439 组曲线近于平坦;(3)从传代实验中可看出, pRL-B1 至少可稳定遗传三代;(4)在细胞这种微环境中, 质粒 pRL-B1 中酯酶基因的表达同抗性库蚊中的抗药性机理一致(抗性基因扩增引起抗药性), 其机制可能也是酯酶基因扩增, 由此引起表达产物(酯酶)的大量增加, 所以在同该酶的底物作用时活性呈明显增加趋势。据此推测重组质粒中的酯酶基因将会随农药的选择而逐代扩增, 从而使酯酶活性逐代增强, 对农药的降解亦将呈增加趋势。

工程菌 HB101/pRL-B1 对  $\alpha$ -NA( $\beta$ -NA) 的高效分解正是酯酶的特性, 由此可知它不仅可表达酯酶 B1, 而且具有高的表达效率。

## 2.4 工程菌的固定化

为使工程菌的应用更趋于实际, 更有应用价值, 充分发挥酯酶的活力, 首要的步骤是将工程菌固定化, 为制得降解有毒、有害、难降解物质的生物反应器提供依据。根据质粒 pRL-B1 在 *E. coli* 中的高效表达, 我们研究了 *E. coli* 中质粒 pRL-B1 的固定化。

用 3% 的海藻酸钠按方法 1.2.5 对含有质粒 pRL-B1 的 *E. coli* 包埋固定, 细胞湿重一般在 10%~20%。根据多次实验, 本研究取细胞的包埋量为 10%。

本实验还进行了包埋细胞经脱毒使用活化再生的实验, 一般包埋细胞的活性可保持一周。将包埋有细胞的固定小球在使用两周后, 放入 LB 培养液中, 在包埋前的培养条件下进行活化再生。活化后的固定细胞仍具有很高的降解  $\alpha$ -NA 和  $\beta$ -NA 的能力。说明 pRL-B1 的固定化细胞具有良好的活化再生性能(图略)。

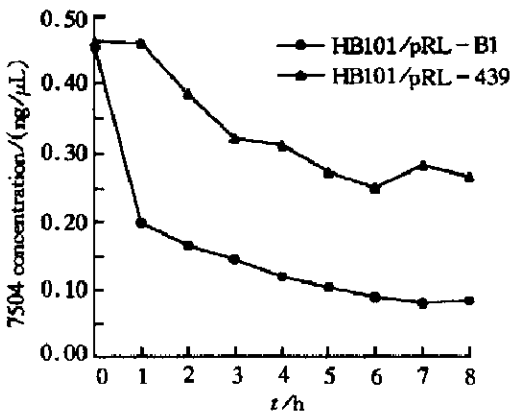


图 6 固定化细胞 HB101/pRL-B1 对农药 7504 的降解

Fig. 6 Degradation of 7504 by immobilized cells HB101/pRL-B1

## 2.5 固定化细胞对农药三氯杀虫酯(7504)的降解

对样品用重蒸正己烷抽提, HB101/pRL-B1 的菌液初始  $OD_{600} = 0.7152$ , HB101/pRL-439 的菌液初始  $OD_{600} = 1.3486$ , 抽提液用于 GC 检测分析。分析结果如图 6 所示。

由图得知:(1)降解速率差异最大处在 0~1 小时, 此区间固定化细胞工程菌 HB101/pRL-B1 对 7504 快速降解, 而 HB101/pRL-439 则几乎没有; 大于 1 小时后, HB101/pRL-B1 对 7504 的降解速率亦趋于平缓。(2)由以上包埋细胞对 7504 的降解实验知, 工程菌 HB101/pRL-B1 是可包埋的, 且活化、再生性能良好;

由上结果可知, 包埋后的细胞对 7504 等农

药有好的降解效果,因此该菌株可作为研制生物反应器的工程菌。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Mouchès C, Pauplin Y, Agarwal M, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**:2574~2578.
- [ 2 ] 吴晓磊,余毓馨,钱 易. *环境科学*, 1994, **25**(4):50~52.
- [ 3 ] Norton S, Watson K, D' Amore T. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, **43**(1):18~24.
- [ 4 ] Ohta T, Ogbonna J C, Tanaka H, *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, **42**(2~3):246~250.
- [ 5 ] Pimentel D. *Bio Science*, 1991, **41**:402~409.
- [ 6 ] Kurit Z T, Wolk C P. *Appl Env. Microbiol*, 1995, **61**:234~238.
- [ 7 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. (金冬雁等译)分子克隆实验指南. 北京:科学出版社,1992.
- [ 8 ] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 北京:高等教育出版社,1993.
- [ 9 ] Ellman G L, Courtney R d, Andres V, *et al.* *Biochem. Pharmacol.* 1961, **7**:88~95.
- [ 10 ] 韩树琴,杨惠芳. *微生物学通报*, 1992, **19**(2):88~91
- [ 11 ] 冷欣夫,乔传令. *科学通报*, 1986, **19**:1505~1508.

## CLONING AND EXPRESSION OF A RESISTANT CULEX GENE IN *ESCHERICHIA COLI* \*

Yan Yuanchun<sup>1,2</sup> Qiao Chuanling<sup>2</sup> Shang Hongyu<sup>3</sup> Qian Chuanfan<sup>4</sup>

(<sup>1</sup> *Life Sciences of College, Shandong Agricultural University, Taian 271018*)

(<sup>2</sup> *Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080*)

(<sup>3</sup> *Madison, WI 53703, USA*)(<sup>4</sup> *China Agricultural University, Beijing 100094*)

**Abstract:** Recombinant plasmid pRLB1 was constructed from detoxifying gene B1 of pesticide resistant *Culex pipiens quinquefasciatus* and from plasmid pRL439 contained the strong promoter PpsbA. The positive clone was identified by digestion and Southern analysis. Expression of recombinant plasmid containing esterase gene was detected. An engineered bacterium possessing high enzyme activity was obtained and immobilized. It can effectively degrade the specific substrate  $\alpha$ -naphthyl acetate ( $\alpha$ -NA) and  $\beta$ -naphthyl of esterase enzyme. Assays showed that pesticide acetofenate (7504 an organic choride pesticide) was degraded by the immobilized cells within one hour.

**Key words:** Esterase gene, Gene expression, *Escherichia coli*, Degradation pesticide

\* Project Granted by Chinese National Natural Science fund(39680001)