

# 耐盐及苯乙酸、甲基对硫磷降解基因工程菌的构建

刘 智 洪 青 徐剑宏 张国顺 李顺鹏\*

(南京农业大学生命科学院 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

**摘 要** HIC (*Halomonas* sp.) 是一株耐高盐浓度(18% NaCl, W/V)和降解苯乙酸的菌株, pDT3 质粒为 pUC19 插入甲基对硫磷水解酶基因(*mpd* 基因)构建而成。采用 *Hind*Ⅲ 酶切, 获得含有完整 *mpd* 基因片段, 克隆到广宿主质粒 pKT230 和 pBBR1-MCS2 上, 构建成质粒 pKT-MP 和 pBBR-MP。通过三亲杂交, 在辅助质粒 pRK2013 的帮助下, 将质粒 pKT-MP 和 pBBR-MP 转移到 H1 中, 得到的工程菌 H-pKT-MP 和 H-pBBR-MP 具有耐盐、降解苯乙酸和水解甲基对硫磷的功能, 其中 H-pBBR-MP 水解酶活性与亲本菌株甲基对硫磷降解菌(*Pseudomonas putida*) DDL-E4 相当, 而 H-pKT-MP 水解酶活性要提高 1 倍左右。经过传代试验, 证明了工程菌的稳定性。

**关键词** 耐盐 苯乙酸 甲基对硫磷 降解 三亲杂交 工程菌

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2003)05-0554-06

含盐废水是指含有高浓度溶解性无机盐的废水, 包括生活废水和含盐工业废水, 主要来源有海水应用于工农业生产和生活所带来的含盐废水<sup>[1]</sup>, 以及一些工业行业特别是化工行业排放大量的含盐量极高的含盐工业废水<sup>[2]</sup>, 例如, 苯乙酸生产污水中含盐量可达 20% ~ 24%, 农药杀虫双生产污水(蒸胺段)含盐量可达 6% ~ 14%。上述废水中一般还含有大量的难降解或有毒有机物, 包括顽抗性化合物(Recalcitrance), 如纤维素、石油、多聚物等和生物异源性物质(Xenobiotics), 如苯环类物质、农药(杀虫剂、除草剂)、卤代芳烃、多环芳烃等。这些物质有很多是致癌和致畸物质, 且在环境中持久性长, 如不经处理就排放到环境中, 将直接危害到陆生和水生生态系统, 通过生物链的富集作用, 积累在生物体中, 威胁人类健康。

生物处理是消除工业废水中有机污染物的最主要和最有效的方法之一, 采用基因工程的方法, 将具有抗性的菌株和具有降解性状的菌株进行遗传重组, 人为创造出既耐各种逆境, 又能高效降解有机污染物的基因工程菌, 将是解决这类废水的一种行之有效的方法。

近年来国内外许多研究人员都致力于环境微生物基因工程菌构建方面的研究, 如 Sharon 等<sup>[3]</sup>将来源于黄杆菌(*Flavobacterium* sp.) ATCC27551 的 *opd* 基因(对硫磷水解酶基因)片段插入到质粒 pIJ702 的 *Bgl* II 位点, 导入链霉菌(*Streptomyces lividans*)中, 得到了稳定产生对硫磷水解酶的转化菌株, 该菌株生产的水解酶已经在农药厂废水处理中得到了

基金项目: 国家“863 计划”(2001AA214121, 2002AA246081); 农业科技跨越计划(M200011); 国家“十五”攻关(2002BA516A01)

\* 通讯作者。Tel 86-25-4396314; Fax 86-25-4396314; E-mail: lsp@njau.edu.cn

作者简介: 刘 智(1975 - )男, 湖北黄梅人, 博士, 主要从事分子生物学研究与应用, 现工作单位华中科技大学生命科学院生物医学工程博士后流动站。E-mail: hmliuzhi@yahoo.com.cn

收稿日期: 2002-12-26, 修回日期: 2003-04-09

应用<sup>[4]</sup>。国内李尔炆等<sup>[5]</sup>通过转化育种的方式构建出降解性工程菌 TEM-1 ,能够同时降解苯甲酸、萘、甲醇和乙二醇 4 种碳源。王永杰等<sup>[6]</sup>通过原生质体转化获得了能同时降解甲胺磷、敌敌畏、对硫磷和乐果的转化工程菌 J-PZ。其中最为著名的是 1975 年 , Chakrabarty 等<sup>[7]</sup>将 CAM、OCT、NAH、TOL 质粒通过接合转移 ,转移到一株 *Pseudomonas* sp. 中 ,得到能降解多种碳氢化合物的“超级菌” ,它在几小时内可将原油中 60% 的烃类分解。这也是美国专利局第一个批准的基因工程菌专利。

本文采用基因工程方法 ,将水解甲基对硫磷的基因转移到耐盐苯乙酸降解菌中 ,构建出能降解多种生物异源性物质并且耐受高浓度盐份的基因工程菌。该工程菌的获得 ,不但可以应用于高盐工业废水的微生物处理 ,而且 ,对于高盐土壤中农药残留的微生物修复具有重要的理论和实践意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

菌株 DLL-1 为一株能完全矿化甲基对硫磷( Methyl Parathion ,MP )的恶臭假单胞菌 ( *Pseudomonas putida* )<sup>[8]</sup> ,菌株 DLL-E4 是 DLL-1 的突变菌株 ,降解 MP 能力提高。菌株 H1 是一株能耐高盐和降解苯乙酸的盐单胞菌( *Halomonas* sp. ) ,由本实验室分离。 *Escherichia coli* WD80( pRK2013 )具有染色体编码的链霉素抗性( Str<sup>r</sup> )和质粒编码的卡那霉素抗性 ( Km<sup>r</sup> ) ,是一株辅助转移菌株。表 1 为本研究所用质粒。

表 1 本研究所用质粒的基本特性  
Table 1 Basic characteristics of plasmids used in this research

Plasmid	Characteristics	Source
pDT3	AMP <sup>r</sup> ,pUC19 + <i>mpd</i> gene fragment	Labortary stock
pBBR1-MCS2	Kan <sup>r</sup> ,broad host vector	Provided by Dr. Jun Zhu
pKT320	Kan <sup>r</sup> ,Str <sup>r</sup> ,broad host vector	Labortary stock
pRT2013	Kan <sup>r</sup> ,help plasmid	Labortary stock
pKT-MP-kan	Kan <sup>r</sup> ,pKT230 + <i>mpd</i> gene	This study
pKT-MP-Str	Str <sup>r</sup> ,pKT230 + <i>mpd</i> gene	This study
pBBR-MP	Kan <sup>r</sup> ,pBBR1-MCS2 + <i>mpd</i> gene	This study

### 1.2 菌株抗生素抗性试验

将 0.1mL 过夜培养好的菌液加到融化的 LB 固体培养基中 ,倒平板 ,待平板凝固后 ,点接抗生素纸片 ,培养过夜 ,观察有无抑菌圈出现。以大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为阴性对照。

### 1.3 耐盐性能测定

在葡萄糖铵盐培养基<sup>[8]</sup>中 ,添加一定浓度的 NaCl ,接种菌株 ,采用比浊法<sup>[9]</sup>测定菌体生长情况。

### 1.4 降解性能测定

在基础盐培养基<sup>[8]</sup>中添加一定浓度的底物( 苯乙酸 ) ,定时取样 ,10000r/min ,离心

10min ,取上清紫外扫描( UV2401 ) ,考察苯乙酸吸收峰( 260nm )变化情况。

1.5 广宿主载体的构建

*Hind*Ⅲ 酶切质粒 pDT3 和载体 pBBR-MCS2 ,分别回收完整的 *mpd* 片段以及线形载体 pBBR-MCS2 ,对后者进行脱磷处理后 ,酶连构建质粒 pBBR-MP ;*Eco*R Ⅰ 酶切载体 pKT230 ,回收线形载体 ,并补平、脱磷 ,同样对获得的 *mpd* 片段进行补平和脱磷处理 ,酶连构建质粒 pKT-MP。构建好的质粒转化入大肠杆菌 DH5α 中 ,*Km* 抗性筛选 ,结合 MP 水解和质粒大小进行验证。限制性内切酶和 DNA fragment 回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司 ,质粒提取和纯化试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司 ,按产品说明操作并参考文献 10 。

1.6 三亲杂交

受体菌、供体菌及辅助转移菌分别于 3mL 含相应抗生素的 LB 培养基中培养过夜 ,按 1:2:1 的比例混合后离心 ,用生理盐水洗涤菌体沉淀 ,重悬于 100μL 生理盐水 ,将菌悬液全部涂到铺在 LB 平板的无菌滤膜上 ,培养 12h ,刮取菌体作适当稀释后 ,涂布相应选择性平板 ,培养后挑取接合子 ,验证性状。

1.7 工程菌降解性能稳定性测定

将工程菌分别在抗性平板和 LB 平板上传代 ,验证每一代的性能 ,并将保存在抗性平板上的传代菌种( 传代 0 次、第 10 次、第 20 次和第 30 次 ) ,于实验室条件下小规模发酵试验 ,French press 压榨破碎细胞悬液 ,制备粗酶液 ,测定工程菌甲基对硫磷水解酶酶活 ,酶活测定参照文献 7 。

2 结果

2.1 耐盐苯乙酸降解菌 H1 特性

耐盐苯乙酸降解菌为盐单胞菌 ,能耐受 1.8mol/L 左右的氯化钠浓度( 图 1 ) ,具有氨苄青霉素抗性( *Amp*<sup>r</sup> )和 *Str* 抗性 ,对 *Kan* 敏感 ,能高效降解苯乙酸( 图 2 )。

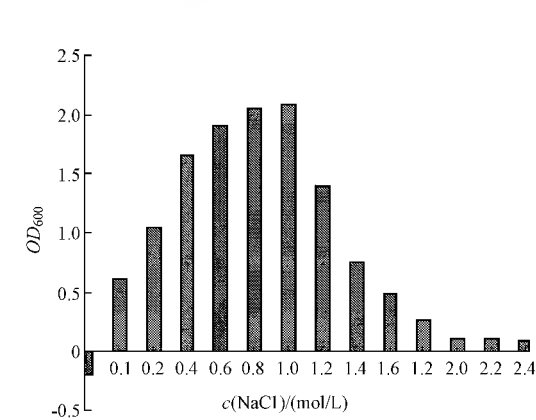


图 1 蓝单胞菌 H1 的耐盐情况  
Fig.1 Salt tolerance of *Halomonas* sp. H1

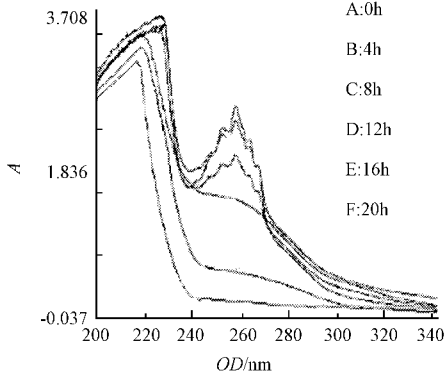


图 2 蓝单胞菌 H1 降解苯乙酸紫外扫描图谱  
Fig.2 Degradation of phenylacetic acid by *Halomonas* sp. H1  
A ,B ,C ,D ,E and F represent the six curves from top to bottom.

2.2 载体构建

通过鸟枪法已从甲基对硫磷降解菌 DLL-E4 中克隆到甲基对硫磷水解酶基因 ( GenBank accession number : AY029773 )。pDT3 即为含有 MP 水解酶的质粒 ,通过 *Hind*Ⅲ 酶切 pDT3 ,获得能够自主表达的 *mpd* 基因片段( 2kb 左右 )。由于受体菌株为我们分离得到的野生菌株 ,基因背景不清楚 ,为保证 *mpd* 基因在该宿主中的稳定存在和表达 ,选择了两种广宿主载体 pKT230 和 pBBR1-MCS2。通过载体构建 ,获得重组质粒 pKT-MP 和 pBBR-MP( 图 3 )。

2.3 具有耐盐、苯乙酸降解和水解 MP 功能的基因工程菌的构建

通过三亲杂交 ,将 pKT-MP 和 pBBR-MP 接合转移到受体菌 H1 中 ,采用碱裂解法 ,提取工程菌质粒。电泳图谱( 图 4 )显示 ,工程菌中出现明显的质粒条带 ,位置与构建的质粒相同 ,证实了基因工程菌的成功构建。

分别点种于高盐( 1mol/L NaCl )+ MP 农药的 LB 培养基以及只添加 MP 农药的 LB 培养基上 ,验证基因工程菌的功能 结果如图 5 所示。

平板上出现黄色的水解圈 ,表明培养基中添加的 MP 农药被分解产生黄色的对硝基苯酚。两个基因工程菌都同时具有耐盐和降解甲基对硫磷的功能 ,而耐盐苯乙酸降解菌 H1 因不能分泌甲基对硫磷水解酶 ,不出现水解圈 ,在高盐 LBMP 平板上 ,DLL-E4 由于不能耐受高盐 ,没有生长 ,也没有形成水解圈( 图 5 左图 )。而基因工程菌在两种条件下都生长良好 ,同时产生水解酶。实验还同时验证了工程菌的其他功能 ,例如降解苯乙酸和耐盐特性等 ,发现带有外源质粒的工程菌没有丢失亲本菌株 H1 的功能。

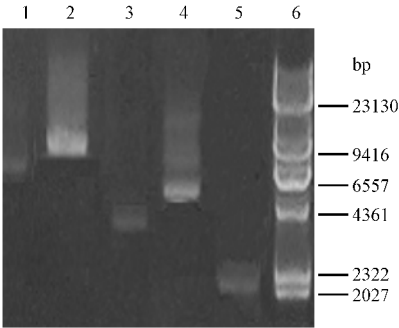


图 3 广宿主质粒 pKT-MP 和 pBBR-MP 电泳图谱  
Fig.3 Electrophoresis profile of broad host plasmid pKT-MP and pBBR-MP  
1. pKT230 ; 2. pKT-MP ; 3. pBBR1-MCS2 ; 4. pBBR-MP ; 5. *mpd* gene fragment ; 6. λDNA/ *Hind*Ⅲ .

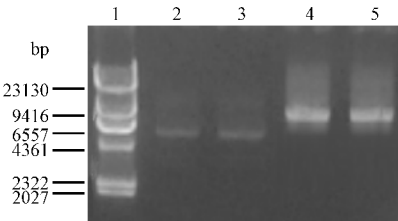


图 4 工程菌 H-pKT-MP 和 H-pBBR-MP 质粒电泳图谱  
Fig.4 Electrophoresis of GEM H-pKT-MP and H-pBBR-MP  
1. λDNA/ *Hind*Ⅲ ; 2. H-pBBR-MP ; 3. pBBR-MP ; 4. H-pKT-MP ; 5. pKT-MP .

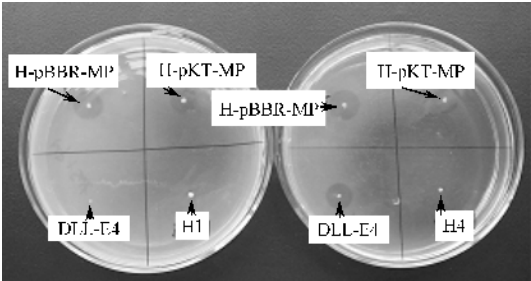


图 5 基因工程菌 H-pKT-MP 和 H-pBBR-MP 在 LBMP 和高盐 LBMP 上的生长  
Fig.5 GEM H-pKT-MP and H-pBBR-MP growing on LB + MP with or without high salt  
Left :MP + LB + NaCl( 1mol/L ) ; Right :LB + MP .

2.4 工程菌的稳定性试验

分别在 Km + LB 平板和 LB 平板上传代工程菌 ,考察降解性状的稳定性。发现 LB 平

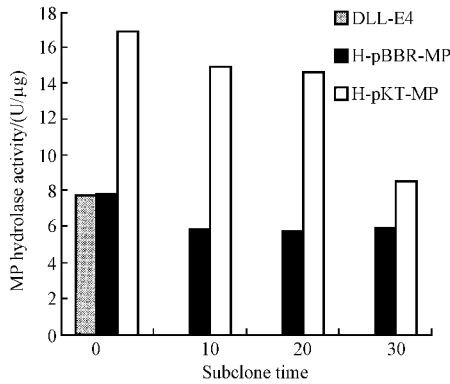


图 6 不同代次的工程菌 H-pKT-MP 和 H-pBBR-MP 的 MP 水解酶酶活力情况

Fig.6 MP hydrolase activity of GEM H-pKT-MP and H-pBBR-MP

板上传代时 ,工程菌 H-pKT-MP 传代 12 次( 250 代 ) ,性能丢失 ,而工程菌 H-pBBR-MP 传代 18 次 ( 450 代 ) ,才发生 MP 水解性能丢失的现象。而在 Km + LB 平板上传代时 ,没有发生性能丢失现象。取 Km + LB 平板传 0、10、20、30 代次的菌株 ,进行小量发酵实验 ,培养 16h ,收集菌体 ,测定 MP 水解酶酶活( 图 6 )。结果表明 ,H-pKT-MP 传代 20 次( 500 代 )左右 ,甲基对硫磷水解酶酶活基本保持稳定 ,但在 30 次( 750 代 )后 ,酶活明显下降。H-pBBR-MP 在传代过程中 MP 水解酶酶活基本保持稳定。转接 0 代时 ,H-pBBR-MP 产生的甲基对硫磷水解酶酶活与出发菌株 DLL-E4 相差不大 ,H-pKT-MP 则具有较高的酶活 ,比出发菌株提高 1 倍左右。

3 讨论

采用基因工程技术可以定向构建工程菌 ,高效

净化这类污染物 ,美国科学家在 80 年代末提出要毫不犹豫地实现将基因工程菌引入污染治理领域内 ,这一领域已经成为当今环境生物技术的热点 ,对降解基因进行克隆和表达 ,构建工程菌 ,可以有有效的拓宽降解谱 ,提高降解菌的降解能力。基因工程菌的构建过程中 ,最常见的问题是外源基因能不能在宿主中稳定地存在 ,以及能不能表现出活性 ,这一点对于基因工程菌的安全性也尤为重要。本研究采用广宿主质粒 pKT230 和 pBBR-MCS2 作为载体 ,这两种载体都能够在根瘤菌、假单胞菌、黄杆菌等中稳定存在。本文研究表明 ,这两种载体在盐单胞菌中也能够保持稳定 ,在不添加抗生素压力的 LB 平板传代 ,H-pKT-MP 能传代 12 次 ,而 H-pBBR-MP 能传代 18 次。在抗性平板上传代时 ,发现 H-pKT-MP 传代 30 次( 450 代 )左右 ,酶活明显下降 ,可能是长期传代导致菌体活性下降引起的。本研究利用 *mpd* 基因自主的表达系统在宿主菌 H1 中进行 MP 水解酶的表达 ,成功地实现了 *mpd* 基因的异体表达 ,表明该 *mpd* 基因的表达系统具有一定的通用性。研究还发现 H-pBBR-MP 产生的甲基对硫磷水解酶酶活与出发菌株 DLL-E4 相差不大 ,而 H-pKT-MP 则具有较高的酶活 ,比出发菌株提高一倍左右 ,这与外源质粒在 H1 中的拷贝数有关。值得注意的是 ,具有较高 MP 水解酶活力的工程菌 H-pKT-MP 稳定性较差 ,这可能与外源基因的大量表达对宿主菌生理活性造成影响有关。下一步的工作将围绕如何改进工程菌的稳定性和提高 MP 水解酶活力开展 ,为尽快将该工程菌应用于工农业生产奠定基础。

参 考 文 献

[ 1 ] 文湘华 ,占新民 ,王建龙 ,等 . 含盐废水的生物处理研究进展 . 环境科学 ,1999 ,5 ( 3 ) :104 ~ 106  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [ 2 ] 何 健, 崔中利, 刘 智, 等. 耐盐降解苯乙酸类菌株 A1( *Arthrobacter* sp. A1 ) 的分离和特性研究. 环境科学学报 2002 **22** ( 3 ) 374 ~ 378.
- [ 3 ] Sharon S, Rowland M K, Speedie, *et al.* Purification and characterization of a secreted recombinant parathion hydrolase( parathion hydrolase ) from *Streptomyces lividans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991 **57** ( 2 ) 440 ~ 444.
- [ 4 ] 戚 新, 许武林. 废水中异生物质合成有机污染物的遗传控制. 环境污染与防治, 1995 **17** ( 2 ) 31 ~ 34.
- [ 5 ] 李尔炆, 史乐文. 一株降解性工程菌的构建. 生物工程进展, 1992 **12** ( 3 ) 30 ~ 33.
- [ 6 ] 王永杰, 李顺鹏. 原生质体转化构建有机磷农药降解工程菌. 应用与环境生物学报, 1999 **5** ( suppl ) 162 ~ 165.
- [ 7 ] Kellogg S T, Chatterjee D K, Chakrabarty A M. Plasmid-assisted molecular breeding : New technique for enhanced biodegradation of persisted toxic chemicals. *Science*, 1981 **214** 1133 ~ 1135.
- [ 8 ] 刘 智, 孙建春, 李顺鹏. 甲基对硫磷降解菌 DLL-1 的分离、鉴定及降解特性研究. 应用与环境生物学报, 1999 **6** ( suppl ) 147 ~ 150.
- [ 9 ] 范秀容, 李广武, 沈 萍. 微生物学实验. 北京 : 高等教育出版社, 1988. 75 ~ 78.
- [ 10 ] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 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, 1998. 72 ~ 108.

## Construction of Genetic Engineering Microorganism of Salt Tolerant Degrading Strain

Liu Zhi Hong Qing Xu Jianhong Zhang Guoshun Li Shunpeng\*

( Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment of Ministry of Agriculture ,  
Life Science College , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China )

**Abstract :** H1( *Halomonas* sp. ) was a strain of salt tolerance( 18% NaCl , *W/V* ) and degrading phenylacetic acid , plasmid pDT3 was a derivation of pUC19 inserted *mpd* gene( methyl parathion degrading gene ) , which is obtained from methyl parathion( MP ) degrading strain DLL-E4( *Pseudomonas putida* ). Recombinant plasmids pKT-MP and pBBR-MP were constructed by inserting *Hind* III fragment( which include whole *mpd* gene ) of pDT3 into broad host vector pKT230 and pBBR1-MCS2. With the aid of help-plasmid pRK2013 , pKT-MP and pBBR-MP were transferred into H1 ( called tri-parent conjugation ) and multi-functioned GEMs H-pKT-MP and H-pBBR-MP were constructed , which were salt tolerant , phenylacetic acid-degrading and MP-degrading. The activity of MP hydrolase of H-pBBR-MP and H-pKT-MP was 1 × and 2 × the one of DLL-E4. The MP hydrolase activity of two GEMs were constant.

**Key words** Salt tolerance , Phenylacetic acid , Methyl parathion , Degradation , Tri-parent conjugation , Genetic engineering microorganism

Foundation item : Chinese National Programs for High Technology Research and Development ( 2001AA214121 , 2002AA246081 ) ; Agricultural Technologies Span Project( M200011 ) ; The 10<sup>th</sup> Five Years Programs for Science and Technology Development of China ( 2002BA516A01 )

\* Corresponding author. Tel 86-25-4396314 ; Fax 86-25-4396314 ; E-mail : lsp@njau.edu.cn

Received date : 12-26-2002